



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

EXPERIMENTAL BIOLOGY and BIOTECHNOLOGY

Издается с января 1969 г.
(с 1969 по 2016 г. – под названием
«Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География»,
с 2017 по 2021 г. – под названием
«Журнал Белорусского государственного университета. Биология»)
Выходит три раза в год

2

2024

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор **ДЕМИДЧИК В. В.** – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by

**Заместитель
главного редактора** **СИДОРОВ А. В.** – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: sidorov@bsu.by

**Ответственный
секретарь** **ФИЛИПЦОВА Г. Г.** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: filiptsova@bsu.by

- Адамович Б. В.* Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Валентювич Л. Н. Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Гельтман Д. В. Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Гурин А. В. Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания.
Кильчевский А. В. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Костюк В. А. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А. Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Лермонтова И. Н. Институт генетики и исследования сельскохозяйственных растений им. Г. В. Лейбница, Гатерслебен, Германия.
Медведев С. С. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Мороз Л. Л. Флоридский университет, Гейнсвилл, США.
Семак И. В. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Стржалка К. Ягеллонский университет, Краков, Польша.
Тихомиров В. Н. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А. Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Чубанов В. С. Институт фармакологии и токсикологии им. Вальтера Штрауба Мюнхенского университета им. Людвига и Максимилиана, Мюнхен, Германия.
Шабала С. Н. Университет Тасмании, Хобарт, Австралия.
Ю Мин Международный исследовательский центр экологической биологии мембран Фошаньского университета, Фошань, Китай.

EDITORIAL BOARD

- Editor-in-chief** **DEMIDCHIK V. V.**, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor; dean of the faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by
- Deputy editor-in-chief** **SIDOROV A. V.**, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: sidorov@bsu.by
- Executive secretary** **FILIPTSOVA G. G.**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: filiptsova@bsu.by
- Adamovich B. V.* Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Chubanov V. S. Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany.
Geltman D. V. V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Gourine A. V. University College of London, London, United Kingdom.
Kilchevsky A. V. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kostyuk V. A. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Kulchiitsky V. A. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Lermontova I. N. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany.
Medvedev S. S. Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Moroz L. L. University of Florida, Gainesville, USA.
Semak I. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Shabala S. N. University of Tasmania, Hobart, Australia.
Strzalka K. Jagiellonian University, Kraków, Poland.
Tikhomirov V. N. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Valentovich L. N. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Yu Min International Research Centre for Environmental Membrane Biology, Foshan University, Foshan, China.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

REVIEWS

УДК 581.192.7

РОЛЬ ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ И ИХ АДАПТАЦИИ К ВНЕШНИМ ФАКТОРАМ

Г. Г. ФИЛИПЦОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Пептидные гормоны растений представляют собой класс сигнальных веществ, участвующих в регуляции процессов роста и развития растительных организмов, а также их адаптации к стрессовым воздействиям. Индукция генов, кодирующих белки – предшественники пептидных гормонов, осуществляется в ответ на разнообразные внешние и внутренние стимулы. Пептидные гормоны воспринимаются растительной клеткой с помощью специфических рецепторов и запускают многоуровневую систему сигналинга, обеспечивающую координацию клеточных процессов при изменяющихся условиях среды, развитие защитных реакций и формирование иммунитета. В настоящей работе проведен анализ современных литературных данных о структуре, функциональной активности и механизмах сигналинга основных групп пептидных гормонов растений.

Ключевые слова: пептидные гормоны растений; механизмы сигналинга; регуляция роста и развития; устойчивость растений.

Образец цитирования:

Филипцова Г.Г. Роль пептидных гормонов в регуляции роста и развития растений и их адаптации к внешним факторам. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024; 2:4–23.
EDN: VCQWYK

For citation:

Filipцова HG. Role of peptide hormones in regulation of plant growth and development and their adaptation to environmental factors. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:4–23.
EDN: VCQWYK

Автор:

Галина Григорьевна Филипцова – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Author:

Halina G. Filiptsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
filiptsova@bsu.by

ROLE OF PEPTIDE HORMONES IN REGULATION OF PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT AND THEIR ADAPTATION TO ENVIRONMENTAL FACTORS

H. G. FILIPTSOVA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Abstract. Plant peptide hormones are a class of signaling substances involved in the regulation of growth and development processes, as well as the adaptation of plant organisms to stress. Induction of genes, which encode precursors of peptide hormones, occurs in response to a variety of external and internal stimuli. Peptide hormones are perceived by specific receptors of plant cells and trigger a multi-level signaling system that ensures the coordination of cellular processes under changing environmental conditions, the development of protective reactions and the formation of immunity. This work analyses recent studies on the structure, functional activity and signaling mechanisms of the main groups of plant peptide hormones.

Keywords: plant peptide hormones; signaling mechanisms; regulation of growth and development; plant resistance.

Введение

В силу прикрепленного образа жизни и необходимости приспособляться к изменяющимся внешним факторам растения приобрели сложную сигнальную систему, обеспечивающую межклеточные коммуникации, а также взаимосвязь организма с окружающей средой. Важнейшим компонентом данной системы являются пептидные гормоны, с помощью которых осуществляются поддержание клеточного гомеостаза, регуляция роста и развития растений, запуск иммунного ответа, противодействие патогенам и вредителям.

К пептидам принято относить соединения, включающие от 2 до 100 аминокислотных остатков и имеющие молекулярную массу менее 10 кДа. Структура и функциональная роль одних пептидов известны достаточно давно (например, глутатион представляет собой трипептид γ -глутамил-цистеинил-глицин и является широко распространенным эндогенным антиоксидантом [1]). Другие пептиды открыты относительно недавно, и выявление их функциональной активности находится на стадии становления. Некоторые растительные пептиды обладают антимикробной активностью и играют важную роль в устойчивости растений к фитопатогенам [2]. Наиболее изученными антимикробными пептидами являются тионины, дефензины (DEF), гевеино- и ноттиноподобные пептиды, циклотиды. Они конститутивно присутствуют во всех частях растений и выступают компонентами врожденного иммунитета [3].

Ряд пептидов являются элементами сигнальных путей, обеспечивающих межклеточные взаимодействия в биологических системах [4; 5]. Исходя из функциональной активности, эти соединения принято называть пептидными гормонами. В отличие от относительно небольшого количества классических фитогормонов, представленных ауксинами, цитокининами, гиббереллинами, абсцизовой кислотой и этиленом, в растениях обнаружено несколько тысяч гормонов пептидной природы [5]. Так, в модельном растении *Arabidopsis thaliana* идентифицировано более 1000 генов, кодирующих пептиды с той или иной биологической активностью [6]. Пептидные гормоны могут конститутивно присутствовать в растительных тканях или индуцироваться в ответ на внешние воздействия. Экспрессия генов конкретных изоформ пептидов происходит в определенных органах и тканях растения, на разных стадиях онтогенеза и, как правило, активируется под действием биотических и абиотических стрессовых факторов.

В растениях пептиды имеют как внеклеточную (апопласт), так и внутриклеточную (цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, вакуоль) локализацию [4]. Они могут продуцироваться в различных органах или накапливаться в отдельных тканях (например, в эпидермисе, проводящих сосудах, устьичных клетках). Пептиды часто синтезируются в виде мультидоменных белков-предшественников или образуются в результате ограниченного протеолиза, а также других способов дегградации белков.

Сигнальные пептиды можно разделить на три группы. Две из них представляют собой секретируемые пептиды, содержащие N-концевую сигнальную последовательность, а одна группа включает несекретируемые пептиды [7]. К секретируемым относятся небольшие посттрансляционно модифицированные пептиды, которые продуцируются посредством протеолитического процессинга, и богатые цистеином

пептиды, характеризующиеся четным числом остатков цистеина, участвующих в формировании внутри-молекулярных дисульфидных связей. В настоящее время идентифицировано 9 семейств посттрансляционно модифицированных пептидов (наиболее изученными среди них являются CLAVATA3 (CLV3), RGF, PSK, PSY1, CEP, CIF, IDA, PIP) и 13 семейств богатых цистеином пептидов (RALF, EPF и EPFL, SCR и др.) [8]. Секретируемые пептиды выделяются из клетки и могут пассивно диффундировать во внеклеточном пространстве, взаимодействуя со специфическими рецепторами на мембранах соседних клеток, либо транспортироваться в другие органы по проводящим тканям. Несекретируемые пептиды, к которым относятся системин (Sys), PEP, ENOD40, выполняют свои функции в той же клетке, в которой были синтезированы, либо попадают в апопласт при разрушении клетки и активируют сигнальные системы соседних клеток.

Характеристика различных групп растительных пептидов представлена в ряде баз данных. В настоящее время наиболее полной является база данных PlantPeptideDB, включающая 3848 уникальных записей растительных пептидов, выделенных из 443 видов растений [9]. Анализ структуры этих пептидов показывает, что около 75 % из них состоят из 50 или менее аминокислотных остатков, остальные имеют длину более 50 аминокислотных остатков.

В зависимости от биологической активности выделяют несколько функциональных групп пептидов, хотя установлено, что один и тот же пептид может обладать несколькими видами биологической активности. В данной работе проведен анализ современных знаний о структуре и биологической активности пептидных гормонов, особенностях их образования и сигналинга.

Биологическая активность пептидных гормонов растений

Современные исследования свидетельствуют о том, что пептидные гормоны регулируют самые разнообразные биохимические, онтогенетические и физиологические процессы, координируя рост и развитие растений, а также их взаимосвязь с окружающей средой [4; 7; 8; 10; 11]. Обычно они представляют собой небольшие молекулы, состоящие из 10–50 аминокислотных остатков, которые образуются из более крупных белков-предшественников или напрямую транслируются из открытых рамок считывания либо микроРНК без протеолиза [5; 7; 12].

Большинство охарактеризованных на сегодняшний день растительных пептидов происходят из нефункциональных белков-предшественников, называемых пребелками. Зрелый пептид образуется после удаления N-концевой сигнальной последовательности, функция которой заключается в направленной секреции пребелка везикулами эндоплазматического ретикулума. Вместе с тем имеются данные о том, что пептидные гормоны могут происходить из функциональных белков-предшественников [12]. Наиболее известными сигнальными пептидами, относящимися к этой группе, являются CAPE, инцептины и субтилазный пептид сои. Их предшественники обладают функциональной активностью, отличной от активности пептидов. К пептидам, образующимся из открытых рамок считывания, относятся ENOD40, PLS, ROT4 и некоторые другие.

Пептидные гормоны могут быть мобильными или связанными с мембраной. Как правило, они распознаются специфическими рецепторами, в большинстве случаев представленными богатыми лейцином рецептороподобными киназами (LRR-RLK) [4; 5].

Пептидные гормоны обладают многими характеристиками классических гормонов растений. Они регулируют рост и развитие растений в низких (нанолярных) концентрациях, могут транспортироваться по симпласту и апопласту на большие расстояния, для их распознавания требуются мембранные рецепторы, а для перевода молекул в активное состояние часто необходимы модификации вторичных группировок. На рис. 1 приведена схема, демонстрирующая участие пептидных гормонов в различных процессах роста и развития растительных организмов. К настоящему времени показана роль пептидных сигналов в защитных реакциях растений, поддержании идентичности ствольных клеток в апикальных меристемах побега и корня, самонесовместимости при опылении крестоцветных растений, а также пролиферации и дифференцировке клеток.

Одной из важнейших функций пептидных гормонов является их участие в развитии ответной реакции растительного организма на действие биотических и абиотических стрессовых факторов, а также ассоциации растений с полезными микроорганизмами. На рис. 2 представлена схема, демонстрирующая участие различных пептидов в формировании устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Эти соединения являются ключевыми сигнальными компонентами при формировании иммунитета к фитопатогенным микроорганизмам, насекомым и нематодам. Также они играют важную роль в адаптации растений к засолению, засухе, гипо- и гипертермии, дефициту азота и фосфора. При этом один и тот же пептид может обладать множеством различных функций или выполнять одну специфическую функцию.



Рис. 1. Участие пептидных гормонов в процессах роста и развития растений
Fig. 1. Participation of peptide hormones in the processes of plant growth and development

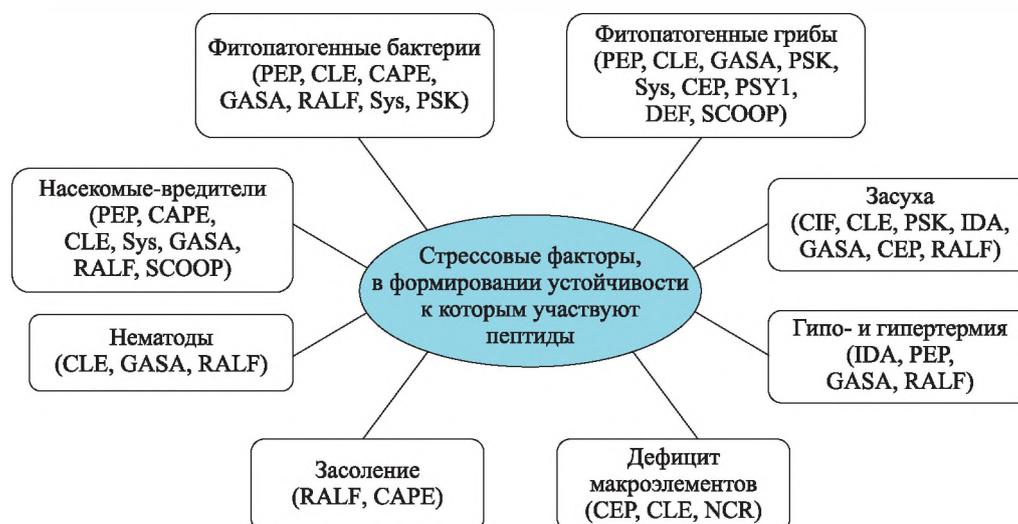


Рис. 2. Участие пептидных гормонов в формировании устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам
Fig. 2. Participation of peptide hormones in the formation of plant resistance to biotic and abiotic stress factors

Характеристика основных групп пептидных гормонов растений

Системины. Системин (Sys) – первый сигнальный пептид, функциональная роль которого была установлена в 1991 г. у растений томата [13]. Он состоит из 18 аминокислот с 4–6 остатками пролина и консервативным мотивом PPKMQTD на С-конце. Данный пептид образуется из белка-предшественника просистемина (ProSys), содержащего 200 аминокислотных остатков, при механическом ранении или повреждении листьев насекомыми-вредителями. Системин воспринимается рецепторами и приводит к запуску системной защиты растений [14].

Схожие пептиды были обнаружены у других представителей пасленовых растений, таких как табак, картофель и перец [15]. Данные пептиды структурно отличаются от системина томата. В частности, они содержат гидроксипролин и поэтому называются гидроксипролинсистеминами (HysSys). Несмотря на структурные различия, HysSys вызывают схожий биологический ответ – активацию системной устойчивости [16].

В 1999 г. на цитоплазматической мембране клеток томата был идентифицирован рецептор системина SR160, представляющий собой трансмембранный белок массой 160 кДа, содержащий внеклеточный домен, богатый лейцином, и внутриклеточный киназный домен [17]. Показано, что рецептор SR160 гомологичен

рецептору брассинолида BRI1 с высоким процентом идентичности аминокислотных последовательностей [18]. Стоит отметить, что это уникальный для растений пример наличия рецептора, запускающего функционально разные сигнальные пути: защитный и регулирующий процессы роста и развития.

При взаимодействии системина с рецептором SR160 происходит индукция сигнального пути, который включает активацию MAP-киназного каскада, состоящего из группы митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) [19], увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, ингибирование протонной АТФазы и быстрое подщелачивание внеклеточной среды [20], активацию фосфолипазы A_2 и высвобождение линоленовой кислоты, которая дает начало сигнальным оксипиринам, таким как фитодиеновая и жасмоновая кислоты, а также повышение уровня экспрессии защитных генов [14; 21; 22]. При этом системин вызывает подавление экспрессии ряда фотосинтетических генов, связанных с фиксацией углерода и метаболизмом углеводов. Таким образом, системин генерирует и усиливает системный сигнал, активируя жасмонатный путь, который запускает синтез соединений, прямо или косвенно воздействующих на вредителей. В работе [14] приводятся данные о том, что под действием системина происходит активация биосинтеза более 20 белков, связанных с защитой растений.

Роль системина в реакции на повреждения была выяснена в ряде исследований с использованием мутантных растений со сверхэкспрессией белка-предшественника ProSys. Системин проявляет активность в нано- и пиколярных концентрациях и способствует увеличению устойчивости растений к таким вредителям, как тля (*Macrosiphum euphorbiae*), личинки чешуекрылых (*Spodoptera littoralis*), фитопатогенные грибы (*Botrytis cinerea* и *Alternaria alternata*) [14; 16; 22]. Показано, что сверхэкспрессия просистемина индуцирует накопление ингибиторов протеаз, которые расщепляют незаменимые аминокислоты в кишечнике травоядных [23]. Растения томата с высоким уровнем экспрессии просистемина синтезируют больше летучих органических соединений, привлекающих паразитоидов тли, в частности *Aphidius ervi* [24].

Недавние исследования показали, что просистемин является предшественником не только системина, но и других низкомолекулярных пептидов, обладающих высокой биологической активностью, в частности пептидов, обозначаемых как PS1-70 и PS1-120 и относящихся к семейству внутренне неупорядоченных белков (IDP) [25]. Эти белки, не имеющие стабильной трехмерной структуры, играют важную роль в клеточных процессах, связанных с реакцией растений на стрессовые воздействия. Структурная пластичность позволяет им принимать альтернативные конформации, которые обеспечивают специфические взаимодействия со множеством молекулярных структур, а также участвовать в контроле клеточного цикла, метаболизма, гормональной передаче сигналов [26].

Пептиды RALF (*rapid alkalisation factor*). Поиск системинных пептидов в растениях табака привел к открытию еще одной группы сигнальных пептидов, обладающих способностью подщелачивать внеклеточную среду, – RALF [27]. В настоящее время пептиды RALF выявлены у многих семенных растений, включая арабидопсис, томат, рис, пшеницу, сою, рапс. Помимо этого, они обнаружены у мохообразных (*Physcomitrella patens*), а также в ряде фитопатогенных бактерий и нематод [28]. Пептиды RALF экспрессируются в различных тканях и органах растений и регулируют их размножение, развитие и реакцию на внешние раздражители. У растений *A. thaliana* семейство RALF включает 38 генов [29].

Пептиды RALF образуются из более крупного белка-предшественника, состоящего из 115 аминокислотных остатков, с массой около 5 кДа. Активная часть пептида включает 49 аминокислот и содержит 4 консервативных остатка цистеина, которые формируют 2 дисульфидных мостика [27].

В 2014 г. был идентифицирован рецептор пептидов RALF – FERONIA (FER), принадлежащий к семейству рецептороподобных киназ (RLK1Ls) [30]. Образование комплекса RALF – FER инициирует запуск путей сигнальной трансдукции, приводящих к изменению ряда клеточных процессов: фосфорилированию H^+ -АТФазы плазматической мембраны и ингибированию транспорта протонов, в результате чего происходит подщелачивание внеклеточного матрикса [30]; активации кальцийпроницаемого канала MLO (*mildew resistance locus O*) и увеличению концентрации цитоплазматического кальция [31]; активации НАДФ-оксидазы и повышению уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках [32].

Пептиды RALF играют важную роль в регуляции процессов роста и развития растений. Большинство представителей семейства RALF вызывают ингибирование роста проростков или их отдельных органов [27; 28; 33; 34]. При экзогенном применении данных пептидов наблюдается резкое торможение роста корней и образования корневых волосков [27]. Исследования на трансгенных растениях арабидопсиса показали, что сверхэкспрессия пептидов RALF1 и RALF23 приводит к появлению карликовых растений [34], что авторы связывают с замедлением роста клеток растяжением. Ингибирование роста также может быть вызвано тем, что комплекс RALF – FER индуцирует транскрипцию рецепторов TIR1/AFB (*transport inhibitor response 1 / auxin-signaling F-box*) и, как следствие, убиквитинзависимую деградацию факторов ответа на ауксин [35]. Имеются данные о том, что пептиды RALF участвуют в брассиностероидопосредованном морфогенезе корня [36], т. е. могут выступать негативными регуляторами растяжения клеток, проявляя антагонизм с брассиностероидами.

Кроме того, пептиды RALF принимают участие в регуляции процесса двойного оплодотворения, в частности в передаче сигналов между мужскими и женскими гаметами, росте и обеспечении целостности кончика пыльцевой трубки [31]. Отмечается наличие функциональной связи между пептидами RALF и кальциевыми сигналами. Установлено, что при нарушении RALF-сигналинга не формируется цитозольный градиент ионов Ca^{2+} , необходимый для образования пыльцевой трубки.

Пептиды RALF4 и RALF34 антагонистически регулируют целостность клеточной стенки пыльцевой трубки и предотвращают ее преждевременный разрыв. Как свидетельствуют результаты работы [37], взаимодействие этих пептидов с рецептором FER выполняет двойную функцию: с одной стороны, обеспечивает проникновение спермия в рыльце пестика, с другой стороны, предотвращает множественное оплодотворение.

Еще одной важной функцией пептидов RALF является регуляция иммунного ответа клетки. При воздействии патогенных микроорганизмов они способны индуцировать два совершенно разных механизма сигналинга [38]. Пептиды RALF, которые расщепляются субтилизинподобной сериновой протеазой (SIP), такие как RALF23 и RALF33, могут ингибировать генерацию АФК, вызванную элиситорами патогена, и снижать иммунитет растений. Пептиды RALF, у которых отсутствует сайт расщепления SIP, например RALF17, способствуют росту концентрации АФК и запуску иммунного ответа. Анализ биологической активности 34 видов пептидов RALF *in vitro* показал, что их роль в иммуномодуляции зависит не только от сайтов расщепления SIP [33]. Иммунный ответ, индуцированный пептидами RALF, включает серию сигнальных реакций, таких как активация MAP-киназного каскада, повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, изменение уровня стрессовых гормонов [32; 39–41]. Эти реакции способствуют увеличению устойчивости растений к биотическим стрессорам. Например, у растений сои пептиды RALF4 и RALF24 повышают устойчивость к *Fusarium oxysporum* [42]. У растений рапса пептид RALF10 вызывает формирование иммунитета к *Sclerotinia sclerotiorum* [43]. При этом некоторые фитопатогенные грибы и нематоды также могут секретировать растительные гомологи RALF для подавления иммунных реакций хозяина и повышения его восприимчивости к болезням [28; 44; 45].

Пептиды RALF играют определенную роль в устойчивости растений к неблагоприятным факторам абиотической природы. Имеются данные об участии этих пептидов в формировании устойчивости растений к солевому стрессу [11; 46; 47]. Сверхэкспрессия пептида RALF8 повышает чувствительность арабидопсиса к засухе. В растениях хлопка пептид RALF33 является регулятором устойчивости к холодному и солевому стрессам [48]. Очевидно, что различные представители семейства RALF обладают разными видами биологической активности и выполняют в растительных организмах множество функций, обеспечивая многоуровневую регуляцию процессов роста, развития и адаптации к неблагоприятным факторам среды.

Пептиды CLE (*CLV3 / embryo surrounding region-related*). Важным компонентом клеточной сигнализации у растений является семейство пептидных гормонов CLE. Впервые ген, кодирующий пептид CLE, был выявлен у кукурузы (*Zea mays*) в 1997 г. [49]. В настоящее время члены семейства генов *CLE* обнаружены у всех исследованных семенных растений, а также печеночника (*Marchantia polymorpha*), мха (*P. patens*), зеленых водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*), это позволяет предположить, что пептиды CLE являются эволюционно-консервативными сигнальными соединениями [50–53]. Растения *A. thaliana* содержат 32 члена семейства генов *CLE*, которые кодируют 27 различных белков-предшественников длиной от 50 до 100 аминокислотных остатков [54]. Почти все органы и ткани этого растения, в том числе листья (за исключением устьичных клеток), стебли, корни, различные органы цветка, экспрессируют 3 и более гена *CLE*. Экспрессия многих генов перекрывается, и между ними могут существовать антагонистические или синергетические взаимодействия [55].

Белки CLE имеют консервативную структуру, включающую N-концевой секреторный сигнальный пептид и консервативный 12–14-аминокислотный CLE-домен на C-конце [56]. Было обнаружено, что наименьшей единицей, проявляющей активность, является пептид из 12 аминокислот. Например, зрелые пептиды CLV3 состоят из 12 или 13 аминокислот (RTVP*SGPDP*LHN(H)), включая 2 остатка гидроксипролина (обозначены как P*), которые могут быть гликозилированы (чаще всего остатками арабинозы) [57]. Гликозилированная форма CLV3 обладает повышенным сродством к своим рецепторам.

В зависимости от функциональной активности выделяют четыре группы пептидов CLE: 1) пептиды, подавляющие развитие апикальной меристемы и дифференцировку клеток проводящих сосудов; 2) пептиды, проявляющие только меристемингибирующую активность; 3) пептиды, осуществляющие дифференцировку клеток сосудов протоксилемы; 4) пептиды, не оказывающие явного влияния на фенотип растений [5; 52].

Биологическая активность пептидов CLE обусловлена их взаимодействием с рецепторами, обнаруженными в большинстве растительных тканей. Наиболее распространенные типы рецепторов этой сигнальной

системы включают различные киназы: богатые лейцином рецептороподобные протеинкиназы, в том числе рецептороподобные белки CLV1 и CLV2, рецептороподобную протеинкиназу RPK2 (*receptor-like protein kinase 2*), рецепторы BAM (*barely any meristems*), CIK (*CLV3 insensitive receptor kinases*) и псевдокиназу CORYNE (CRN) [53; 58; 59]. У растений *A. thaliana* охарактеризовано несколько рецепторов, с которыми могут связываться пептиды CLE, – CLV1, CLV2, RPK2, рецептороподобная протеинкиназа ACR4, PXY/TDR и SOL2/CRN [54; 60–62]. Функциональные различия между этими типами рецепторных комплексов и нижестоящие компоненты активируемых сигнальных путей пока изучены недостаточно. Имеются исследования, свидетельствующие об участии MAP-киназы и G-белков в этом процессе, а также о наличии взаимосвязи между передачей сигналов CLE и ауксина [63].

Пептидные гормоны CLE регулируют многие физиологические процессы. Наиболее значимая роль этих гормонов заключается в поддержании гомеостаза апикальной меристемы побега и количества органов цветка, делении и дифференцировке клеток меристемы корней, формировании архитектуры корневой системы, образовании проводящих сосудов, ауторегуляции развития клубеньков, регуляции микоризных симбиотических отношений [51; 52; 55; 57; 63].

Непрерывный рост органов у растений зависит от пролиферации и дифференцировки меристематических клеток, что обеспечивается сигнальным пептидом CLV3 и транскрипционным фактором WUSCHEL (WUS), между которыми формируется отрицательная обратная связь [57]. Транскрипционный фактор WUS поддерживает недифференцированное состояние меристематических клеток [64]. Сигнальный пептид CLV3, наоборот, способствует их дифференцировке. Взаимодействие пептида CLV3 с рецептором CLV1 приводит к ингибированию транскрипционного фактора WUS. Поддержание функциональной активности апикальной меристемы побега также опосредовано параллельными CLV1-независимыми путями, связанными с рецепторами CLV2, CRN и LRR-RLK ERECTA [53].

Экспрессия гена *CLV3* наблюдается преимущественно в первом и втором слоях клеток центральной зоны меристемы. У мутантных растений с молчащими генами *clv1*, *clv2* и *clv3* дифференцировка клеток апикальной меристемы побега замедляется, и размер центральной зоны сильно увеличивается [55]. Схожие эффекты характерны для других пептидов CLE, таких как CLE42 и CLE44. Показано, что гиперэкспрессия генов, кодирующих данные пептиды, приводит к появлению кустарниковидных карликовых растений, у которых отсутствует верхушечное доминирование [65].

В работе [52] установлено, что экзогенное применение пептидов CLE1 – CLE7 или сверхэкспрессия их предшественников приводят к подавлению регенерации побегов *A. thaliana*, что обусловлено репрессией транскрипционного фактора WUS. Схожее биологическое действие пептиды CLE оказывают на меристему корней, способствуя дифференцировке клеток [65]. В работе [51] установлено, что в апикальной меристеме корня пептиды CLE являются негативными регуляторами, а пептиды RGF (*root growth factor*) – положительными регуляторами поддержания деления меристематических клеток.

Пептиды CLE функционируют в еще одном типе делящихся клеток, называемых сосудистой меристемой, или прокамбием. Прокамбиальные клетки находятся между флоэмой и ксилемой и могут дифференцироваться в оба типа проводящих сосудов. Пептиды CLE оказывают влияние на развитие сосудов как в пространстве, так и во времени [57]. Судьбу прокамбиальных клеток определяет пептид, называемый фактором ингибирования дифференцировки трахеарных элементов (*tracheary element differentiation inhibitory factor*, TDIF). Он является додекапептидом с 2 остатками гидроксипролина (HEVP*SGP*NPISN). Аминокислотная последовательность пептида TDIF идентична аминокислотной последовательности пептидов CLE41 и CLE44 у арабидопсиса. Показано, что гиперэкспрессия пептида CLE44, а также экзогенная обработка растений арабидопсиса этим пептидом способствуют делению клеток прокамбия и ингибируют дифференцировку ксилемы. Другие пептиды CLE влияют на развитие флоэмы. Например, пептид CLE25 способствует дифференцировке флоэмы, а пептид CLE45 ее ингибирует [51]. Представленные данные свидетельствуют о сложной регуляторной системе, управляющей развитием проводящих элементов. Предполагается, что биологическая активность пептидов TDIF связана с их влиянием на PIN-опосредованный полярный транспорт ауксина [66].

Стоит отметить, что пептиды CLE играют важную роль не только в эндогенных программах развития растений, но и в реакциях на действие факторов среды, включая симбиотические взаимодействия с микроорганизмами. Показано, что пептиды CLE участвуют в образовании клубеньков у ряда бобовых растений, таких как лядвенец (*Lotus japonicus*), соя (*Glycine max*) и люцерна (*Medicago truncatula*) [55]. Также они индуцируются при взаимодействии растений с фитопатогенными нематодами и микроорганизмами. В работе [67] установлено, что пептиды CLE могут осуществлять индукцию иммунитета. Они воспринимаются рецептором бактериального белка флагеллина (FLS2) и вызывают серию врожденных иммунных реакций, ограничивающих распространение бактериальных фитопатогенов. Кроме того, пептиды CLE участвуют в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессорам, таким

как засуха и дефицит макроэлементов [59]. Так, экзогенная обработка растений пептидом CLE9 индуцирует закрытие устьиц и повышает устойчивость к засухе, что связывают с активацией MAPK3 и двух сигнальных компонентов замыкающих клеток – АБК-протеинкиназы OST1 (*open stomata 1*) и анионного канала SLAC1 (*slow anion channel 1*) [10]. Пептид CLE45 играет значительную роль в реакции растений на высокотемпературный стресс [68].

Пептиды CLE участвуют в регуляции азотного, фосфорного и углеводного обмена растений. Показано, что при низком уровне азота в клетках перицикла корней активируются гены *CLE1*, *CLE3*, *CLE4* и *CLE7*, это приводит к подавлению роста боковых корней [69]. При достаточном количестве этого элемента усиливается экспрессия гена *CLE2*. Пептид CLE14 опосредует развитие стрессового сигнала при низком содержании фосфатов в корнях. Он оказывает влияние на соотношение процессов деления и дифференцировки клеток апикальной меристемы корня, ингибируя первичный рост корней [70]. Вероятно, этот сигнальный путь позволяет растениям адаптироваться к уровню фосфатов в среде: в условиях их дефицита растения изменяют скорость роста корней, чтобы увеличить поглощение необходимых макроэлементов.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что пептиды CLE действуют как медиаторы экологических и физиологических стимулов, обеспечивая строгую координацию внутренних процессов развития растений при адаптации к изменяющимся условиям среды.

Пептиды PEP (*plant elicitor peptides*). Важную роль в устойчивости растений к стрессовым факторам играют пептиды PEP, обладающие элиситорными свойствами. Они представляют собой большую группу пептидов, содержащих от 23 до 36 аминокислотных остатков. Данные пептиды образуются в растениях из более крупных белков-предшественников в ответ на стрессовые воздействия, воспринимаются растительными клетками с помощью специфических рецепторов и запускают каскад защитных реакций, таких как активация протеинкиназ и фосфорилирование белков, образование вторичных мессенджеров, синтез стрессовых гормонов и повышение уровня экспрессии защитных генов, приводящих в итоге к формированию фитоиммунитета [71–74].

Первый представитель пептидных элиситоров растений был выделен в 2006 г. из листьев *A. thaliana* и назван AtPep1 [75]. Данный пептид состоит из 23 аминокислот (ATKVKAKQRGKEK VSSGRPGQHN) и образуется из С-терминального конца более крупного белка-предшественника PROPEP1. К настоящему времени пептиды PEP идентифицированы у более чем 50 видов растений из семейств крестоцветных, пасленовых, бобовых, розоцветных и злаковых [76]. В растениях *A. thaliana* обнаружено 8 гомологов AtPep и, соответственно, 8 белков-предшественников, которые кодируются небольшим семейством генов. У арабидопсиса было идентифицировано 8 генов *PROPEP* [77], у кукурузы – 7 генов *PROPEP* [78], у брокколи – 9 генов *PROPEP* [79]. У других видов исследованных растений их количество, как правило, ограничено 1–2 генами [80].

Белки PROPEP обнаружены в двух разных субклеточных компартментах – цитозоле и тонопласте [76]. Индукция генов, кодирующих данные белки, осуществляется при механическом повреждении листьев бактериальными, грибковыми и вирусными патогенами, а также при обработке растений стрессовыми гормонами [81–83]. Установлено, что PEP-зависимая передача сигналов вызывает активацию фитоиммунитета и приводит к увеличению устойчивости растений к стрессовым воздействиям как биотической, так и абиотической природы [71; 76; 79; 84; 85].

Рецепторы эндогенных пептидных элиситоров, обозначаемые как PEPR, представляют собой трансмембранные белки, расположенные на цитоплазматической мембране и принадлежащие к классу богатых лейцином рецептороподобных киназ [86; 87]. На примере пептидного элиситора AtPep1 установлено, что при его взаимодействии с рецептором наблюдаются повышение уровня циклического гуанозинмонофосфата и активация нуклеотидзависимых катионных каналов CNGC2 (*cyclic nucleotide-gated cation channel 2*), обеспечивающих вход внеклеточного кальция в цитоплазму. Увеличение концентрации ионов Ca^{2+} запускает ряд Ca^{2+} -зависимых путей сигнализации, приводящих к активации НАДФ-оксидазы и повышению уровня супероксидных анион-радикалов и перекиси водорода в апопласте, активации кальмодулина и кальмодулинподобных белков и синтезу NO в клетке, а также активации кальцийзависимых протеинкиназ [88; 89]. Механизмы PEP-сигналинга и их роль в устойчивости растительных организмов к биотическим стрессовым факторам ранее были представлены в обзорной статье [90].

В работе [91] продемонстрировано, что пептидные элиситоры оказывают влияние на устойчивость растений не только к биотическим, но и к абиотическим неблагоприятным факторам, например окислительному стрессу. Показано, что экзогенная обработка растений пептидом AtPep1 вызывает индукцию сигнальных систем с участием АФК, активацию антиоксидантных ферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы, в результате чего происходит снижение скорости окислительных процессов в растениях, подвергнутых окислительному стрессу. Очевидно, что пептиды PEP представляют собой важное звено

в формировании устойчивости растений к разнообразным стрессовым воздействиям, усиливая защитный ответ клетки. На примере брокколи продемонстрирована роль пептидов PER в устойчивости растений к засолению [79]. Авторы показали, что экзогенная обработка проростков пептидом BoPer4 повышает их толерантность к избыточному количеству хлорида натрия в среде за счет снижения соотношения Na^+ и K^+ в цитоплазме, повышения уровня абсцизовой кислоты и стимуляции накопления воска и кутина в листьях. Кроме того, имеются данные о том, что при восприятии пептидов AtPer происходят повышение уровня этилена и жасмоновой кислоты [92], активация синтеза вторичных метаболитов [85], торможение роста корневой системы [93; 94].

Пептиды CEP (*C-terminally encoded peptides*). Значительную роль в реакции растений на действие факторов среды играют пептидные гормоны CEP. Они представляют собой посттрансляционно модифицированные пептиды, образующиеся из консервативного С-конца белка-предшественника и состоящие из 14 или 15 аминокислотных остатков [95]. Зрелые пептиды CEP содержат 1 либо 2 гидроксильных или арабинозиллированных остатка пролина, что влияет на гибкость белка и его способность взаимодействовать с рецепторами [96].

Гены, кодирующие белки – предшественники пептидов CEP, идентифицированы в таких растениях, как арабидопсис, соя, сорго, рапс, кукуруза и рис [97]. В геноме *A. thaliana* обнаружено 15 генов CEP [98]. Их экспрессия изменяется под действием различных абиотических стрессов, в том числе низкого уровня азота в среде. Показано, что пептиды CEP из клеток корня поступают в ксилему и перемещаются в направлении побега, где взаимодействуют с рецепторами CEP1 и CEP2 [99]. У растений люцерны (*M. truncatula*) их ортологом является рецептор CRA2 (*compact root architecture 2*) [100]. При взаимодействии пептидов CEP с рецепторами индуцируется серия реакций, приводящих к изменению архитектуры корня. Установлено, что пептиды CEP оказывают влияние на полярный транспорт ауксина и ингибируют рост корней, но при этом способствуют образованию клубеньков и росту побегов [101]. Различные гомологи CEP могут обладать разными типами биологической активности. Так, пептид CEP5 отрицательно влияет на развитие первичных и боковых корней у арабидопсиса, но при этом увеличивает устойчивость растения к осмотическому стрессу и засухе [102]. Пептид CEP1 способствует поглощению нитратов корнями посредством активации генов, кодирующих глутатионзависимые оксидоредуктазы класса III (глутаредоксины), которые положительно влияют на экспрессию генов высокоаффинного переносчика нитратов [103]. Авторами показано, что регуляторные пути CEP1 связаны с цитокининовым сигналингом, благодаря чему обеспечивается лучшая координация ассимиляции азота в условиях азотного голодания и роста корней.

Сульфатированные пептидные гормоны. Как следует из названия, к данной группе гормонов относятся посттрансляционно модифицированные пептиды, активация которых связана с сульфатированием одного или нескольких остатков тирозина. Этот процесс происходит с участием специального фермента – тирозилпротеинсульфотрансферазы, переносящей сульфат с фосфоаденозинфосфосульфата на гидроксильную группу определенных тирозиновых остатков белка-предшественника с образованием тирозин-сульфатного эфира [104]. Установлено, что консервативным мотивом для сульфатирования является последовательность аспарагиновая кислота – тирозин (DY) на N-конце белка-предшественника. Сульфатный фрагмент обеспечивает стабильность и высокую биологическую активность пептидного гормона, специфичность его распознавания рецептором [105]. Согласно данным, приведенным в работе [106], несulfатированные пептиды имеют в 185 раз более низкое сродство к рецептору. Они активны в микромолярных концентрациях, тогда как биологическая активность сульфатированных пептидов наблюдается в наномолярном диапазоне. Помимо высокой специфичности и сродства к рецепторам, тирозинсульфатированные пептиды достаточно стабильны в условиях варьирования pH среды, что обуславливает их активность в апопласте при высокой кислотности [107].

К настоящему времени обнаружено несколько типов сульфатированных пептидных гормонов – фитосульфокнины (PSK), пептид PSY1 (*plant peptide containing sulfated tyrosine 1*), фактор роста корневой меристемы RGF1 (*root meristem growth factor 1*), факторы целостности поясков Каспари CIF (*Casparian strip integrity factors*) [105; 108].

Фитосульфокнины. Впервые фитосульфокнины были обнаружены в культуре клеток спаржи (*Asparagus officinalis*) как положительные факторы пролиферации [109]. Они представляют собой пентапептиды ($\text{Y}^* \text{IY}^* \text{TQ}$), содержащие 2 сульфатированных остатка тирозина (обозначены как Y^*). Фитосульфокнины образуются из белков-предшественников, состоящих из 75–123 аминокислот [110]. Эти достаточно консервативные белки выявлены у 53 видов однодольных и двудольных растений, включая *A. thaliana*, сою (*G. soja*), рапс (*Brassica napus*), кукурузу (*Z. mays*), рис (*Oryza sativa*) и др. [105]. Растения арабидопсиса содержат 7 генов белков – предшественников PSK. Транскриптомный анализ позволил выявить, что экспрессия фитосульфокнинов осуществляется во всех тканях и на всех стадиях развития растений [111].

Однако наиболее высокий уровень экспрессии генов, кодирующих данные пептиды, обнаружен в апикальных меристемах побега и корня, что свидетельствует об участии фитосульфоксинов в процессах деления клеток.

Фитосульфоксины воспринимаются локализованными в плазматической мембране богатыми лейцином рецептороподобными протеинкиназами, обозначаемыми как PSKR1 и PSKR2 [107]. Связывание PSK с рецептором происходит главным образом за счет образования водородных связей, при этом сульфатные фрагменты взаимодействуют со специфическими сайтами рецептора [112]. Для успешного протекания этого процесса требуются кислые условия среды, т. е. закисление апопласта может стимулировать восприятие фитосульфоксинов и усиливать передачу сигнала.

Показано, что рецептор PSKR1 образует нанокластер с H^+ -АТФазами АНА1 и АНА2 (*Arabidopsis H⁺-ATPases*) и ионными каналами CNGC17, активируемыми циклическими нуклеотидами (*cyclic nucleotide-gated cation channel 17*) [113]. Помимо этого, рецептор PSKR1 обладает гуанилатциклазной активностью. Образование комплекса PSK – PSKR1 приводит к запуску серии сигнальных путей, таких как Ca^{2+} -сигналинг, гуанилатциклазный и кальмодулинзависимый сигналинг [114; 115].

Фитосульфоксины выполняют множество физиологических функций. Они стимулируют соматический эмбриогенез [116] и образование адвентивных корней [117]. На примере растений циннии (*Zinnia elegans*) установлено, что PSK участвуют в дифференцировке клеток мезофилла и формировании проводящих сосудов [118]. Фитосульфоксины способствуют удлинению гипокотыля, росту листьев и корней, причем ростостимулирующая активность PSK обусловлена не индукцией деления клеток, а увеличением их размеров [105; 109]. Физиологическая активность фитосульфоксинов может быть связана с их влиянием на соотношение фитогормонов: они активируют синтез ауксина и ингибируют образование этилена [119; 120].

Имеются данные о том, что фитосульфоксины играют важную роль в процессе семенного размножения растений, способствуют прорастанию пыльцы и удлинению пыльцевой трубки [121]. Авторами отмечено, что растения, у которых отсутствуют рецепторы фитосульфоксинов, производят меньше семян.

Еще одной важной функцией фитосульфоксинов является участие в развитии иммунных реакций растений. Интересно отметить, что в зависимости от типа патогена фитосульфоксины могут по-разному влиять на иммунитет. Так, в работах [122; 123] установлено, что мутантные растения арабидопсиса, нечувствительные к PSK, были более восприимчивы к некротрофным фитопатогенным грибам *A. brassicicola* и *S. sclerotiorum* и бактериям *Ralstonia solanacearum*. При этом устойчивость растений к геми- и биотрофам, таким как *Pseudomonas syringae* и *Hyaloperonospora arabidopsidis*, наоборот, повышалась.

Фитосульфоксины оказывают влияние на устойчивость растений к абиотическим негативным факторам. Так, при осмотическом стрессе в растениях арабидопсиса увеличивается экспрессия 4 генов фитосульфоксинов – *PSK1*, *PSK3*, *PSK4* и *PSK5* [124]. Согласно данным, представленным в работе [10], растения, сверхэкспрессирующие предшественник PSK1, характеризуются не только усиленным ростом корней и гипокотыля, но и повышенной устойчивостью к засухе.

Поскольку фитосульфоксины активируют передачу сигналов ауксина и запуск ауксинзависимого кальциевого сигналинга [119; 125], предполагается, что они управляют механизмами перераспределения ресурсов растений, координируя процессы роста и иммунных реакций, и это позволяет выработать наиболее подходящую стратегию при адаптации растений к изменяющимся условиям внешней среды.

Пептид PSY1. Данный пептид был выделен из культуры клеток модельного растения *Arabidopsis* [126]. Он представляет собой сульфатированный и гликозилированный пептид, состоящий из 18 аминокислот. Пептид PSY1 образуется из небольшого белка-предшественника, содержащего 75 аминокислотных остатков и кодируемого у арабидопсиса 3 ядерными генами. Подобно фитосульфоксинам, пептид PSY1 способствует пролиферации и увеличению размеров клеток. Он экспрессируется в различных растительных тканях, но наиболее высокий уровень экспрессии характерен для зоны удлинения корня и апикальной меристемы побега [126]. Запуск PSY1-сигналинга осуществляется с помощью специфического рецептора PSY1R, после чего происходят активация H^+ -АТФазы АНА2, закисление внеклеточного пространства и повышение растяжимости клеточной стенки [127].

Механическое повреждение усиливает экспрессию пептида PSY1, что свидетельствует о его важной роли в устойчивости растений к биотическим стрессорам [105]. Например, в работе [128] приводятся данные о том, что передача сигналов PSY повышает устойчивость растений к некротрофному фитопатогенному грибу *A. brassicicola*.

Фактор роста корневой меристемы RGF1. Было замечено, что для мутантных растений *Arabidopsis tpst-1* с низкой активностью фермента тирозилпротеинсульфотрансферазы характерен особый фенотип с короткими корнями. Обработка растений пептидами PSK и PSY1 не восстанавливала дефекты мутантов *tpst-1*, что указывало на наличие других пептидов, регулирующих рост корней [5]. Поиск сульфатированных гормонов с данным видом биологической активности привел к обнаружению пептида, названного

фактором роста корневой меристемы RGF1 [109]. Экзогенное применение этого пептида возобновляло меристематическую активность мутантных растений *Arabidopsis tpst-1*, а совместное использование RGF1, PSK и PSY1 полностью восстанавливало рост корней.

В настоящее время обнаружено несколько пептидов, относящихся к семейству RGF. Они состоят из 13–18 аминокислотных остатков и содержат типичный для сульфатированных пептидов DY-мотив и высококонсервативный гидроксильированный остаток пролина. Пептиды RGF воспринимаются с помощью рецепторов RGFR1 – RGFR5, что приводит к последующему взаимному трансфосфорилированию цитоплазматических киназных доменов и запуску сигнального каскада с участием MAP-киназы [129]. Помимо своей активности в апикальной меристеме корня, пептиды RGF контролируют гравитропизм, развитие боковых корней и корневых волосков [130]. Члены семейства RGF влияют на поток ауксина, изменяя распределение переносчика ауксина PIN2 [131]. Установлено, что у растений *A. thaliana* пептид RGF1 регулирует активность первичной корневой меристемы и при этом подавляет развитие боковых корней путем активации экспрессии транскрипционного фактора PUCHI через MAP-киназный сигналинг [132].

Факторы целостности поясков Каспари CIF. Относительно недавно в растениях обнаружена еще одна группа сульфатированных пептидов (CIF), контролирующая процесс отложения гидрофобных компонентов клеточной стенки (лигнина или суберина) в клетках эндодермы [133]. В отличие от других тирозинсульфатированных пептидов CIF выполняют одну высокоспецифичную функцию – формирование поясков Каспари, что и обусловило их название.

Геном *A. thaliana* содержит 5 генов, кодирующих пептиды семейства CIF, состоящие из 82 аминокислотных остатков [134]. На С-конце белков-предшественников находится высококонсервативный домен, дающий начало зрелой форме пептидов CIF. Пептиды CIF состоят из 21–24 аминокислот с 1 сульфатированным тирозином и 2 гидроксильированными остатками пролина.

Стоит отметить, что пептиды CIF действуют локально, преимущественно они экспрессируются в стеле первичных и боковых корней [135]. Сульфатирование остатков тирозина обеспечивает полную биологическую активность CIF и их высокое сродство к рецепторам GSO1/SGN3 и GSO2/SGN3, которые локализируются на мембранах клеток эндодермы и относятся к подсемейству богатых лейцином рецептороподобных киназ [136]. Взаимодействие CIF с рецептором приводит к увеличению концентрации перекиси водорода в апопласте, активации специфических пероксидаз и полимеризации монолигнолов, в результате чего образуется лигнин и формируются пояски Каспари.

Пептиды ENOD40 (early nodulin 40). Для бобовых растений характерно наличие специфических пептидов, регулирующих взаимоотношения растения-хозяина с симбиотическими бактериями рода *Rhizobium*, а также формирование клубеньков, или нодул. К таким пептидам относится ENOD40. Развитие нодулы зависит от скоординированной экспрессии растительных и бактериальных генов. Ген нодулина *enod40* быстро индуцируется ризобиями в перицикле корня и делящихся клетках коры зачатка клубенька [137].

Известна структура по меньшей мере двух пептидов ENOD40, состоящих из 12 и 24 аминокислотных остатков. Оба пептида связываются с белком нодулином, который взаимодействует с ферментом сахарозосинтазой [138]. Очевидно, что пептиды ENOD40 участвуют в регуляции метаболизма сахарозы в азотфиксирующих клубеньках, и это в значительной степени влияет на скорость их развития. Показано, что трансгенные растения люцерны (*M. truncatula*) со сверхэкспрессией гена *enod40* характеризуются ускоренным формированием структуры клубенька, тогда как растения с уменьшенным количеством транскриптов *enod40* образуют лишь несколько модифицированных клубенькоподобных структур [139].

Гены *enod40* высококонсервативны у различных видов бобовых растений. Также они обнаружены у некоторых растений из других семейств, таких как табак (*Nicotiana tabacum*) и рис (*O. sativa*) [140; 141]. Функции данных пептидов у этих растений пока не изучены.

Пептиды NCR (nodule cysteine-rich). Важную роль в формировании клубеньков играет еще одна группа пептидных гормонов растений – NCR. По структуре эти пептиды схожи с антимикробными пептидами дефензинами [142]. Как правило, они содержат 25–55 аминокислотных остатков, в том числе 4 или 6 остатков цистеина. Аминокислотные последовательности пептидов NCR могут быть разнообразными, в связи с чем они делятся на катионные, анионные и нейтральные. Структура NCR в основном не упорядочена, очень динамична и сшита посредством дисульфидных связей.

Бобовые культуры экспрессируют значительное количество пептидов NCR. У люцерны усеченной (*M. truncatula*) было выявлено более 650 пептидов NCR, у люцерны посевной (*M. sativa*) – 469, у гороха (*Pisum sativum*) – 353, у нута (*Cicer arietinum*) – 63 пептида NCR [143; 144]. При этом гены, кодирующие NCR, не обнаружены в сое (*G. max*) и лядвенце (*L. japonicus*). Отсутствие пептидов NCR у некоторых бобовых растений свидетельствует о том, что они не являются обязательными компонентами азотфиксации. Вероятнее всего, с помощью этих пептидов растения контролируют развитие симбиотических

бактерий в целях оптимизации процесса азотфиксации. У растений, синтезирующих пептиды NCR, их количество и состав оказывают влияние на степень развития бактериоидов [144; 145]. Показано, что данные пептиды секретируются через растительные мембраны и проникают в бактериоиды, вызывая изменения дифференцировки клеток. Недавние исследования свидетельствуют о том, что один из самых коротких пептидов NCR – NCR247, состоящий из 24 аминокислот, – способствует усвоению железа и увеличению активности бактериоидной нитрогеназы [146]. Потеря отдельных генов *NCR* вызывает быстрое старение бактериоидов. Кроме того, установлено, что уровень экспрессии пептидов NCR зависит от содержания нитратов в среде. В частности, при добавлении нитрата экспрессия генов *NCR* в растениях снижается [145].

Пептиды EPF (*epidermal pattern factor*) и EPFL (*EPF-like*). Пептиды EPF и EPFL состоят из 45–76 аминокислот с 6 или 8 консервативными остатками цистеина, определяющими их функциональную активность [147]. Роль этих пептидов главным образом связана с развитием и функционированием устьиц. Замыкающие клетки устьиц образуются при асимметричном делении меристематических материнских клеток. Частота деления данных клеток, которая контролируется пептидами EPF и EPFL, является основным фактором, определяющим количество устьичных и неустыичных эпидермальных клеток.

В растениях происходит синтез нескольких членов семейства EPF и EPFL. Они обнаружены у *A. thaliana* [148], риса (*O. sativa*) [149] и других растений, в том числе мха (*P. patens*) и плаунка (*S. moellendorffii*) [5].

В качестве рецепторов пептидов EPF и EPFL выступают рецептороподобные киназы ERECTA (ER), ERL1 (*ER-like 1*), ERL2 (*ER-like 2*) и рецептороподобный белок TMM (*too many mouths*) [150]. Сигналы пептидов EPF1, EPF2 и EPFL9 воспринимаются комплексом TMM – ER, что приводит к запуску MAP-киназного каскада YODA-МКК-МПК.

Различные члены семейства EPF и EPFL оказывают разнонаправленное действие на формирование устьичных клеток. Пептиды EPF1 и EPF2 экспрессируются исключительно в эпидермальных клетках и являются отрицательными регуляторами плотности устьиц [148]. Сверхэкспрессия генов *EPF1* и *EPF2* блокирует образование устьиц. Наоборот, потеря их функциональной активности вызывает чрезмерное деление и увеличение количества устьиц. Положительным регулятором в процессе формирования устьиц является пептид EPFL9, или STOMAGEN [151]. Он образуется в клетках мезофилла и конкурирует с пептидами EPF1 и EPF2 за связывание с комплексом TMM – ER. Таким образом, антагонистические взаимоотношения между этими гормонами позволяют осуществлять регуляцию количества устьиц в соответствии с эндогенными программами развития.

Имеются исследования, свидетельствующие о том, что один из генов, кодирующих члены семейства EPFL, специфически экспрессируется в пограничных доменах различных органов побега и регулирует размер меристемы побега, расположение листьев и семян, а также морфогенез края листа [152].

Пептиды GASA (*gibberellic acid-stimulated Arabidopsis*). Низкомолекулярные белки GASA представляют собой продукты семейства генов арабидопсиса, стимулируемых гиббереллиновой кислотой. Для них характерно наличие N-концевого сигнального домена, гидрофильного среднего сегмента и C-концевого консервативного домена, состоящего примерно из 60 аминокислот с 12 остатками цистеина [153]. Длина белков может сильно варьироваться. Например, у арабидопсиса обнаружены белки GASA, содержащие от 87 до 275 аминокислотных остатков. Белки GASA обычно образуют 5–6 дисульфидных связей, которые необходимы для стабилизации пространственной структуры, а также взаимодействия с другими белками. При этом отсутствие ключевых аминокислотных остатков цистеина может привести к образованию нефункционального домена и, как следствие, к потере биологической активности пептида [154; 155].

Идентифицировано около 445 генов, кодирующих белки GASA, у 33 видов растений [156]. Результаты биоинформационного анализа данных показывают, что гены *GASA* имеются у многих видов сосудистых растений, но отсутствуют у мхов и зеленых водорослей. Например, растения кукурузы и риса содержат по 10 членов семейства генов *GASA*, в геноме сои и мягкой пшеницы идентифицировано по 37 генов *GASA*, тогда как у твердой пшеницы выявлено только 19 таких генов [157; 158]. Гены, кодирующие белки GASA, индуцируются фитогормонами и участвуют в запуске ряда сигнальных путей [159]. Было показано, что транскрипция генов *GASA* существенно изменяется в ответ на экзогенную обработку гиббереллиновой и абсцизовой кислотами [158]. Предполагается, что белки GASA играют важную роль в сложных перекрестных взаимодействиях между сигнальными путями, индуцируемыми различными фитогормонами.

Функции пептидов GASA достаточно многообразны и зависят от субклеточного расположения. На примере твердой пшеницы установлено, что большинство пептидов GASA локализуется в апопласте, но некоторые из них располагаются в цитоплазматической мембране и эндомембранах [159]. Члены семейства GASA регулируют многие физиологические процессы растений, причем они могут выполнять

как сходные, так и противоположные функции. Например, сверхэкспрессия гена *GASA4* приводит к увеличению массы семян и урожайности растений, тогда как сверхэкспрессия гена *GASA5* снижает скорость роста стебля и задерживает цветение [160].

Пептиды *GASA* активно участвуют в реакциях растения на действие абиотических негативных факторов, таких как осмотический стресс, УФ-излучение, гипертермия и др. [155]. Установлено, что при неблагоприятных воздействиях среды экспрессия гена *GASA14* повышается, а экспрессия гена *GASA5*, наоборот, снижается [161]. Кроме того, гены *GASA* индуцируются биотическими стрессорами, такими как фитопатогенные грибы, бактерии, вирусы, а также нематоды, что предполагает их важную роль в формировании иммунитета растения [159].

Недавние исследования свидетельствуют о том, что участие пептидов *GASA* в росте растений и их реакциях на стресс опосредовано транскрипционным фактором *DELLA*, являющимся негативным регулятором гиббереллиновых сигналов, и синтезом белков теплового шока [159]. Однако функциональная связь между этими компонентами пока не изучена.

Пептиды *IDA* (*inflorescence deficient in abscission*) и *IDL* (*IDA-like*). Пептиды *IDA* и *IDL* были идентифицированы как факторы, которые инициируют опадение органов цветка после оплодотворения и формирования семян [162]. Растения арабидопсиса содержат 6 членов семейства *IDA* и *IDL*. Эти пептиды образуются из небольшого белка-предшественника, состоящего из 77 аминокислотных остатков. Сигнальный пептид *IDA* включает 26 аминокислот, расположенных на N-конце белка-предшественника.

Пептиды *IDA* взаимодействуют с рецепторами *HAESA* (*HAE*) и *HSL2* (*HAE-like 2*), расположенными на поверхности клеток отделительного слоя, что приводит к запуску MAP-киназного каскада и повышению уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты, осуществляющие гидролиз полисахаридов клеточных стенок [163].

В геноме арабидопсиса выявлено 8 генов *IDA* и *IDL*, экспрессия которых увеличивается при снижении в тканях уровня ауксинов и повышении концентрации этилена [162]. Обычно это происходит при старении листьев и цветков, созревании плодов, но может осуществляться и под действием стрессовых факторов. Имеются данные об участии пептидов *IDA* в опадении листьев при засухе [164]. Эти пептиды индуцируют разрушение клеточной стенки и, следовательно, разделение клеток, вызывая опадение органов.

Еще одна важная функция пептидов *IDA* – регуляция роста боковых корней [163]. В клетках основного корня данные пептиды активируют экспрессию генов, способствующих разрыхлению клеточных стенок коры и росту боковых корней.

Пептиды *SCR* (*S-locus cystein-rich*). Пептиды *SCR* были обнаружены у крестоцветных растений. Они состоят из 47–60 аминокислотных остатков и содержат 8 остатков цистеина [165]. Для пептидов *SCR* характерна консервативная трехмерная структура, состоящая из α -спирали и трехцепочечного антипараллельного β -листа, стабилизированного 4 дисульфидными связями [166].

Данные пептиды содержатся в пыльце и отвечают за самонесовместимость, позволяющую избежать самооплодотворения. При попадании пыльцевого зерна на рыльце пестика происходит взаимодействие сигнального пептида *SCR* пыльцы с рецепторной киназой *SRK* (*S-locus receptor kinase*), расположенной на плазматической мембране клеток пестика. В результате этого индуцируется киназный каскад, приводящий к активации аквапоринов и обезвоживанию поверхности пестика, следствием чего являются дегидратация и отторжение пыльцы [167].

Пептиды *SCOOP* (*serine-rich endogenous peptides*). У представителей семейства крестоцветных было выявлено еще одно специфическое семейство богатых серином эндогенных пептидов – *SCOOP* [168]. Эти пептиды образуют трехмерную структуру в форме шпильки, обнажая 2 остатка серина, определяющих их функциональную активность.

Растения *A. thaliana* содержат 14 генов, кодирующих белки – предшественники *SCOOP* [168]. Пептиды *SCOOP* относятся к секретируемым пептидам с различными типами функциональной активности, однако главной из них является защитная активность. Некоторые пептиды данного семейства, например *SCOOP12*, участвуют в передаче защитных сигналов посредством их восприятия рецепторным комплексом, включающим *MIK2* (*male discoverer 1-interacting receptor-like kinase 2*) [169; 170].

Установлено, что пептид *SCOOP12* влияет на устойчивость растений к фитопатогенам, окислительному стрессу, а также определяет рост корневой системы [168]. Растения с дефектом гена, кодирующего данный пептид, более восприимчивы к *Erwinia amylovora*, но при этом для них характерен усиленный рост корней. Показано, что экзогенная обработка растений арабидопсиса синтетическим пептидом *SCOOP12* вызывает развитие различных защитных реакций, в том числе поддержание АФК-гомеостаза и активацию фосфолипидного сигнального пути [171]. В работе [170] продемонстрировано, что восприятие эндогенного пептида *SCOOP12* рецептором *MIK2* индуцирует жасмонатный сигнальный путь и приводит к повышению устойчивости арабидопсиса к травоядным насекомым, таким как *S. littoralis*.

Пептид SCOOP10 участвует в регуляции процессов цветения [172]. Мутации генов, кодирующих данный пептид, приводят к увеличению экспрессии цветочных генов *LEAFY* и более раннему переходу к генеративной стадии онтогенеза.

Пептиды CAPE (*CAP-derived peptides*). Изначально пептиды CAPE были идентифицированы у растений томата как члены суперсемейства богатых цистеином белков, связанных с патогенезом (PR1) [173]. В настоящее время известно, что пептиды CAPE широко распространены. Они встречаются у представителей как двудольных, так и однодольных растений [174].

Пептиды CAPE состоят из 11 аминокислотных остатков с консервативным мотивом PAGNYIGARPY, расположенным на С-конце белка-предшественника. На примере растений томата и арабидопсиса показано, что пептиды CAPE участвуют не только в иммунном ответе растений на действие фитопатогенов и насекомых-вредителей, но и в реакции на засоление. Например, образование пептида AtCAPE1 в растениях *A. thaliana* активируется при их обработке хлоридом натрия [174]. Этот пептид снижает толерантность растений к засолению, подавляя несколько генов солеустойчивости, ответственных за синтез осмолитиков, детоксикацию продуктов обмена, защиту клеточных мембран, а также закрывание устьиц.

Заключение

Несмотря на то что выявление и исследование пептидных гормонов растений началось только в конце XX в., к настоящему времени накоплено огромное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о значительной роли этих соединений в регуляции биохимических и физиологических процессов растительных организмов. Пептидные гормоны широко распространены в царстве растений. Они представляют собой важное звено в функционировании сигнальных путей, обеспечивающих регуляцию клеточного цикла, координацию роста и развития растительного организма, его взаимосвязь с окружающей средой.

В растениях обнаружено несколько тысяч сигнальных пептидов. Одни из них характерны для всех растительных организмов, другие – только для определенных семейств. Пептидные гормоны обладают многими характеристиками классических гормонов, в частности воспринимаются с помощью специфических рецепторов и проявляют активность в низких концентрациях. Ряд пептидных гормонов конститутивно присутствуют в растительных тканях, некоторые индуцируются в ответ на внешние воздействия биотической и абиотической природы. Помимо регуляции процессов роста и развития, одной из важнейших функций пептидных гормонов является формирование устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Они функционируют как медиаторы внешних стимулов, обеспечивая адаптацию растительных организмов к изменяющимся условиям среды. Исследование механизмов сигналинга пептидных гормонов находится на стадии становления. Очевидно, что их расшифровка позволит не только понять физиологическую роль того или иного пептида, но и разработать новые стратегии управления процессами роста растений и повышения их устойчивости к стрессовым факторам.

Библиографические ссылки / References

1. Dorion S, Ouellet JC, Rivoal J. Glutathione metabolism in plants under stress: beyond reactive oxygen species detoxification. *Metabolites*. 2021;11(9):641–673. DOI: 10.3390/metabo11090641.
2. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*. 2017;133:117–138. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.09.018.
3. Lima AM, Azevedo MIG, Sousa LM, Oliveira NS, Andrade CR, Freitas CDT, et al. Plant antimicrobial peptides: an overview about classification, toxicity and clinical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;214:10–21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.043.
4. Roy S, Lundquist P, Udvardi M, Scheible W-R. Small and mighty: peptide hormones in plant biology. *Plant Cell*. 2018;30(8):tpc.118.tt0718. DOI: 10.1105/tpc.118.tt0718.
5. Kondo Y, Hirakawa Y, Fukuda H. Peptide ligands in plants. In: Machida Y, Lin C, Tamanoi F, editors. *Signaling pathways in plants*. Amsterdam: Academic Press; 2014. p. 85–112 (The enzymes; volume 35). DOI: 10.1016/B978-0-12-801922-1.00004-X.
6. Lease KA, Walker JC. The *Arabidopsis* unannotated secreted peptide database, a resource for plant peptidomics. *Plant Physiology*. 2006;142(3):831–838. DOI: 10.1104/pp.106.086041.
7. Matsubayashi Y. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65:385–413. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120122.
8. Gancheva MS, Malovichko YV, Poliushkevich LO, Dodueva IE, Lutova LA. Plant peptide hormones. *Fiziologiya rastenii*. 2019;66(2):83–103. Russian. DOI: 10.1134/S001533031901007X.
9. Das D, Jaiswal M, Khan FN, Ahamad S, Kumar S. PlantPepDB: a manually curated plant peptide database. *Scientific Reports*. 2020;10:2194. DOI: 10.1038/s41598-020-59165-2.
10. Kim JS, Jeon BW, Kim J. Signaling peptides regulating abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:704490. DOI: 10.3389/fpls.2021.704490.

11. Xie H, Zhao W, Li W, Zhang Y, Hajný J, Han H. Small signaling peptides mediate plant adaptations to abiotic environmental stress. *Planta*. 2022;255(4):72. DOI: 10.1007/s00425-022-03859-6.
12. Tavormina P, Coninck BD, Nikonorova N, Smet ID, Cammue BPA. The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions. *Plant Cell*. 2015;27(8):2095–2118. DOI: 10.1105/tpc.15.00440.
13. Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 1991;253(5022):895–897. DOI: 10.1126/science.253.5022.895.
14. Ryan CA. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1477(1–2):112–121. DOI: 10.1016/s0167-4838(99)00269-1.
15. Constabel CP, Yip L, Ryan CA. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Molecular Biology*. 1998;36(1):55–62. DOI: 10.1023/A:1005986004615.
16. Ryan CA, Pearce G. Systemins: a functionally defined family of peptide signal that regulate defensive genes in Solanaceae species. *PNAS*. 2003;100(supplement 2):14577–14580. DOI: 10.1073/pnas.1934788100.
17. Scheer JM, Ryan CA. A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell*. 1999;11(8):1525–1535. DOI: 10.2307/3870980.
18. Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T, Bishop GJ. Cloning the tomato *curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase TBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell*. 2002;14(12):3163–3176. DOI: 10.1105/tpc.006379.
19. Meindl T, Boller T, Felix G. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell*. 1998;10(9):1561–1570. DOI: 10.1105/tpc.10.9.1561.
20. Scheer JM, Ryan CA. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *PNAS*. 2002;99(14):9585–9590. DOI: 10.1073/pnas.132266499.
21. Stratmann J, Scheer J, Ryan CA. Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a beta-glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *PNAS*. 2000;97(16):8862–8867. DOI: 10.1073/pnas.97.16.8862.
22. Coppola M, Corrado G, Coppola V, Cascone P, Martinelli R, Digilio MC, et al. Prosystemin overexpression in tomato enhances resistance to different biotic stresses by activating genes of multiple signaling pathways. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2015;33:1270–1285. DOI: 10.1007/s11105-014-0834-x.
23. Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *PNAS*. 2005;102(52):19237–19242. DOI: 10.1073/pnas.0509026102.
24. Corrado G, Sasso R, Pasquariello M, Iodice L, Carretta A, Cascone P, et al. Systemin regulates both systemic and volatile signaling in tomato plants. *Journal of Chemical Ecology*. 2007;33:669–681. DOI: 10.1007/s10886-007-9254-9.
25. Molisso D, Coppola M, Buonanno M, Di Lelio I, Aprile AM, Langella E, et al. Not only systemin: prosystemin harbors other active regions able to protect tomato plants. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:887674. DOI: 10.3389/fpls.2022.887674.
26. Covarrubias AA, Cuevas-Velazquez CL, Romero-Pérez PS, Rendón-Luna DF, Chater CCC. Structural disorder in plant proteins: where plasticity meets sessility. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(17):3119–3147. DOI: 10.1007/s00018-017-2557-2.
27. Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *PNAS*. 2001;98(22):12843–12847. DOI: 10.1073/pnas.201416998.
28. Zhang R, Shi P-T, Zhou M, Liu H-Z, Xu X-J, Liu W-T, et al. Rapid alkalization factor: function, regulation, and potential applications in agriculture. *Stress Biology*. 2023;3:16. DOI: 10.1007/s44154-023-00093-2.
29. Olsen AN, Mundy J, Skriver K. Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. *In Silico Biology*. 2002;2(4):441–451. PMID: 12611624.
30. Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff BB, Sussman MR. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*. 2014;343(6169):408–411. DOI: 10.1126/science.1244454.
31. Gao Q, Wang C, Xi Y, Shao Q, Hou C, Li L, et al. RALF signaling pathway activates MLO calcium channels to maintain pollen tube integrity. *Cell Research*. 2023;33:71–79. DOI: 10.1038/s41422-022-00754-3.
32. Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, et al. The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):329–338. DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.009.
33. Abarca A, Franck CM, Zipfel C. Family-wide evaluation of rapid alkalization factor peptides. *Plant Physiology*. 2021;187(2):996–1010. DOI: 10.1093/plphys/kiab308.
34. Srivastava R, Liu J-X, Guo H, Yin Y, Howell SH. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2009;59(6):930–939. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2009.03926.x.
35. Li L, Chen H, Alotaibi SS, Pěnčík A, Adamowski M, Novák O, et al. RALF1 peptide triggers biphasic root growth inhibition upstream of auxin biosynthesis. *PNAS*. 2022;119(31):e2121058119. DOI: 10.1073/pnas.2121058119.
36. Bergonci T, Ribeiro B, Ceciliato PHO, Guerrero-Abad JC, Silva-Filho MC, Moura DS, et al. *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(8):2219–2230. DOI: 10.1093/jxb/eru099.
37. Duan Q, Liu MCJ, Kita D, Jordan SS, Yeh FL, Yvon R, et al. FERONIA controls pectin- and nitric oxide-mediated male – female interaction. *Nature*. 2020;579(7800):561–566. DOI: 10.1038/s41586-020-2106-2.
38. Stegmann M, Monaghan J, Smakowska-Luzan E, Rovenich H, Lehner A, Holton N, et al. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science*. 2017;355(6322):287–289. DOI: 10.1126/science.aal2541.
39. Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, et al. Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell*. 2014;54(1):43–55. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.02.021.
40. Guo H, Nolan TM, Song G, Liu S, Xie Z, Chen J, et al. FERONIA receptor kinase contributes to plant immunity by suppressing jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 2018;28(20):3316–3324. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.078.
41. Haruta M, Monshausen G, Gilroy S, Sussman MR. A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. *Biochemistry*. 2008;47(24):6311–6321. DOI: 10.1021/bi8001488.
42. Liu Y, Chen Y, Jiang H, Shui Z, Zhong Y, Shang J, et al. Genome-wide characterization of soybean RALF genes and their expression responses to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:1006028. DOI: 10.3389/fpls.2022.1006028.
43. He YH, Zhang Z-R, Xu Y-P, Chen S-Y, Cai X-Z. Genome-wide identification of rapid alkalization factor family in *Bassica napus* and functional analysis of BnRALF10 in immunity to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:877404. DOI: 10.3389/fpls.2022.877404.

44. Duan Z, Liu W, Li K, Duan W, Zhu S, Xing J, et al. Regulation of immune complex formation and signalling by FERONIA, a busy goddess in plant – microbe interactions. *Molecular Plant Pathology*. 2022;23(11):1695–1700. DOI: 10.1111/mpp.13256.
45. Dodueva I, Lebedeva M, Lutova L. Dialog between kingdoms: enemies, allies and peptide phytohormones. *Plants*. 2021;10(11):2243. DOI: 10.3390/plants10112243.
46. Feng W, Kita D, Peaucelle A, Cartwright HN, Doan V, Duan Q, et al. The FERONIA receptor kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca²⁺ signaling. *Current Biology*. 2018;28(5):666–675. DOI: 10.1016/j.cub.2018.01.023.
47. Zhao C, Jiang W, Zayed O, Liu X, Tang K, Nie W, et al. The LRXs-RALFs-FER module controls plant growth and salt stress responses by modulating multiple plant hormones. *National Science Review*. 2021;8(1):nwa149. DOI: 10.1093/nsr/nwa149.
48. Xu Y, Magwanga RO, Jin D, Cai X, Hou Y, Juyun Z, et al. Comparative transcriptome analysis reveals evolutionary divergence and shared network of cold and salt stress response in diploid D-genome cotton. *BMC Plant Biology*. 2020;20:518. DOI: 10.1186/s12870-020-02726-4.
49. Opsahl-Ferstad HG, Deunff EL, Dumas C, Rogowsky PM. *ZmEsr*, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant Journal*. 1997;12(1):235–246. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1997.12010235.x.
50. Yamaguchi YL, Ishida T, Sawa S. CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(16):4813–4826. DOI: 10.1093/jxb/erw208.
51. Song X-F, Hou X-L, Liu C-M. CLE peptides: critical regulators for stem cell maintenance in plants. *Planta*. 2021;255:5. DOI: 10.1007/s00425-021-03791-1.
52. Kang J, Wang X, Ishida T, Grienerberger E, Zheng Q, Wang J, et al. A group of CLE peptides regulates de novo shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2022;235(6):2300–2312. DOI: 10.1111/nph.18291.
53. Bashyal S, Gautam CK, Müller LM. CLAVATA signaling in plant – environment interactions. *Plant Physiology*. 2024;194(3):1336–1357. DOI: 10.1093/plphys/kiad591.
54. Cock JM, McCormick S. A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiology*. 2001;126(3):939–942. DOI: 10.1104/pp.126.3.939.
55. Betsuyaku S, Sawa S, Yamada M. The function of the CLE peptides in plant development and plant – microbe interactions. *The Arabidopsis Book*. 2011;9:e0149. DOI: 10.1199/tab.0149.
56. Matsubayashi Y. Small post-translationally modified peptide signals in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. 2011;9:e0150. DOI: 10.1199/tab.0150.
57. Hirakawa Y. CLAVATA3, a plant peptide controlling stem cell fate in the meristem. *Peptides*. 2021;142:170579. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170579.
58. Hu C, Zhu Y, Cui Y, Cheng K, Liang W, Wei Z, et al. A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signaling to maintain stem cell homeostasis. *Nature Plants*. 2018;4:205–211. DOI: 10.1038/s41477-018-0123-z.
59. Basu U, Parida SK. CLAVATA signaling pathway receptors modulate developmental traits and stress responses in crops. In: Upadhyay SK, Shumayla, editors. *Plant receptor-like kinases. Role in development and stress*. Amsterdam: Academic Press; 2023. p. 371–392. DOI: 10.1016/B978-0-323-90594-7.00004-1.
60. De Smet I, Vassileva V, De Rybel B, Levesque MP, Grunewald W, Van Damme D, et al. Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science*. 2008;322(5901):594–597. DOI: 10.1126/science.1160158.
61. Wang J, Kucukoglu M, Zhang L, Chen P, Decker D, Nilsson O, et al. The *Arabidopsis* LRR-RLK, *PXC1*, is a regulator of secondary wall formation correlated with the TDIF-PXY/TDR-WOX4 signaling pathway. *BMC Plant Biology*. 2013;13:94. DOI: 10.1186/1471-2229-13-94.
62. Hazak O, Hardtke CS. CLAVATA 1-type receptors in plant development. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(16):4827–4833. DOI: 10.1093/jxb/erw247.
63. Willoughby AC, Nimchuk ZL. WOX going on: CLE peptides in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 2021;63:102056. DOI: 10.1016/j.pbi.2021.102056.
64. Jha P, Ochatt SJ, Kumar V. WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling. *Plant Cell Reports*. 2020;39(4):431–444. DOI: 10.1007/s00299-020-02511-5.
65. Strabala TJ, O'Donnell PJ, Smit A-M, Ampomah-Dwamena C, Martin EJ, Netzler N, et al. Gain-of-function phenotypes of many *CLAVATA3/ESR* genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved *CLAVATA3/ESR* domain. *Plant Physiology*. 2006;140(4):1331–1344. DOI: 10.1104/pp.105.075515.
66. Yang S, Bai J, Wang J. TDIF peptides regulate root growth by affecting auxin homeostasis and *PINs* expression in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2020;251:109. DOI: 10.1007/s00425-020-03406-1.
67. Lee H, Chah O-K, Sheen J. Stem-cell-triggered immunity through CLV3p – FLS2 signalling. *Nature*. 2011;473(7347):376–379. DOI: 10.1038/nature09958.
68. Endo S, Shinohara H, Matsubayashi Y, Fukuda H. A novel pollen – pistil interaction conferring high-temperature tolerance during reproduction via CLE45 signaling. *Current Biology*. 2013;23(17):1670–1676. DOI: 10.1016/j.cub.2013.06.060.
69. Ma D, Endo S, Betsuyaku S, Shimotohno A, Fukuda H. CLE2 regulates light-dependent carbohydrate metabolism in *Arabidopsis* shoots. *Plant Molecular Biology*. 2020;104(6):561–574. DOI: 10.1007/s11103-020-01059-y.
70. Gutiérrez-Alanis D, Yong-Villalobos L, Jiménez-Sandoval P, Alatorre-Cobos F, Oropeza-Aburto A, Mora-Macías J, et al. Phosphate starvation-dependent iron mobilization induces CLE14 expression to trigger root meristem differentiation through CLV2/PEPR2 signaling. *Developmental Cell*. 2017;41(5):555–570. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.05.009.
71. Bartels S, Boller T. Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(17):5183–5193. DOI: 10.1093/jxb/erv180.
72. Chen YL, Fan KT, Hung SC, Chen YR. The role of peptides cleaved from protein precursors in eliciting plant stress reactions. *New Phytologist*. 2020;225(6):2267–2282. DOI: 10.1111/nph.16241.
73. Zelman AK, Berkowitz GA. Plant elicitor peptide (Pep) signaling and pathogen defense in tomato. *Plants*. 2023;12(15):2856. DOI: 10.3390/plants12152856.
74. Jing Y, Zou X, Sun C, Qin X, Zheng X. Danger-associate peptide regulates root immunity in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2023;663:163–170. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.04.091.
75. Huffaker A, Pearce G, Ryan CA. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *PNAS*. 2006;103(26):10098–10103. DOI: 10.1073/pnas.0603727103.

76. Bartels S, Lori M, Mbengue M, van Verk M, Klauser D, Hander T, et al. The family of Peps and their precursors in *Arabidopsis*: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(17):5309–5321. DOI: 10.1093/jxb/ert330.
77. Huffaker A, Ryan CA. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *PNAS*. 2007;104(25):10732–10736. DOI: 10.1073/pnas.0703343104.
78. Huffaker A, Dafoe NJ, Schmelz EA. ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. *Plant Physiology*. 2011;155(3):1325–1338. DOI: 10.1104/pp.110.166710.
79. Wang A, Guo J, Wang S, Zhang Y, Lu F, Duan J, et al. BoPEP4, a C-terminally encoded plant elicitor peptide from Broccoli, plays a role in salinity stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):3090. DOI: 10.3390/ijms23063090.
80. Lori M, van Verk MC, Hander T, Schatowitz H, Klauser D, Flury P, et al. Evolutionary divergence of the plant elicitor peptides (Peps) and their receptors: interfamily incompatibility of perception but downstream signaling. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(17):5315–5325. DOI: 10.1093/jxb/erv236.
81. Ross A, Yamada K, Hiruma K, Yamashita-Yamada M, Lu X, Takano Y, et al. The *Arabidopsis* PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *The EMBO Journal*. 2013;33:62–75. DOI: 10.1002/embj.201284303.
82. Uemura T, Hachisu M, Desaki Y, Ito A, Hoshino R, Sano Y, et al. Soy and *Arabidopsis* receptor-like kinases respond to polysaccharide signals from *Spodoptera* species and mediate herbivore resistance. *Communications Biology*. 2020;3:224. DOI: 10.1038/s42003-020-0959-4.
83. Huffaker A, Pearce G, Veyrat N, Erb M, Turlings TCJ, Sartor R, et al. Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *PNAS*. 2013;110(14):5707–5712. DOI: 10.1073/pnas.1214668110.
84. Safaeizadeh M. Endogenous peptide signals in *Arabidopsis thaliana*, their receptors and their role in innate immunity. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 2019;9(1):1–11. DOI: 10.22058/JPMB.2022.548053.1251.
85. Lee MW, Huffaker A, Crippen D, Robbins RT, Goggin FL. Plant elicitor peptides promote plant defences against nematodes in soybean. *Molecular Plant Pathology*. 2018;19:858–869. DOI: 10.1111/mpp.12570.
86. Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *PNAS*. 2006;103(26):10104–10109. DOI: 10.1073/pnas.0603729103.
87. Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, Tax FE, Ryan CA. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2010;22(2):508–522. DOI: 10.1105/tpc.109.068874.
88. Ma Y, Walker RK, Zhao Y, Berkowitz GA. Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *PNAS*. 2012;109(48):19852–19857. DOI: 10.1073/pnas.1205448109.
89. Ma Y, Zhao Y, Walker RK, Berkowitz GA. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca²⁺-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca²⁺ signal. *Plant Physiology*. 2013;163(3):1459–1471. DOI: 10.1104/pp.113.226068.
90. Filiptsova HG. The role of endogenous elicitor peptides in plant resistance to biotic stress. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;2:3–12. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-2-3-12.
91. Filiptsova HG, Yurin VM. Physiological and biochemical mechanisms of plants resistance to oxidative stress under peptide elicitor AtPep1. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;3:38–46. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-3-38-46.
92. Gully K, Hander T, Boller T, Bartels S. Perception of *Arabidopsis* AtPep peptides, but not bacterial elicitors, accelerates starvation-induced senescence. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:1–10. DOI: 10.3389/fpls.2015.00014.
93. Poncini L, Wyrsh I, Dénervaud Tendon V, Vorley T, Boller T, Geldner N, et al. In root of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signaling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS ONE*. 2017;12(10):e0185808. DOI: 10.1371/journal.pone.0185808.
94. Okada K, Kubota Y, Hirase T, Otani K, Goh T, Hiruma K, et al. Uncoupling root hair formation and defence activation from growth inhibition in response to damage-associated Pep peptides in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2021;229(5):2844–2858. DOI: 10.1111/nph.17064.
95. Ohyama K, Ogawa M, Matsubayashi Y. Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant Journal*. 2008;55(1):152–160. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2008.03464.x.
96. Taleski M, Imin N, Djordjevic MA. CEP peptide hormones: key players in orchestrating nitrogen-demand signalling, root nodulation, and lateral root development. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(8):1829–1836. DOI: 10.1093/jxb/ery037.
97. Aggarwal S, Kumar A, Jain M, Sudan J, Singh K, Kumari S, et al. C-terminally encoded peptides (CEPs) are potential mediators of abiotic stress response in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2020;26(10):2019–2033. DOI: 10.1007/s12298-020-00881-4.
98. Delay C, Imin N, Djordjevic MA. CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(17):5383–5394. DOI: 10.1093/jxb/ert332.
99. Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, Matsubayashi Y. Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*. 2014;346(6207):343–346. DOI: 10.1126/science.1257800.
100. Mohd-Radzman NA, Laffont C, Ivanovici A, Patel N, Reid D, Stougaard J, et al. Different pathways act downstream of the CEP peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. *Plant Physiology*. 2016;171(4):2536–2548. DOI: 10.1104/pp.16.00113.
101. Chapman K, Ivanovici A, Taleski M, Sturrock CJ, Ng JLP, Mohd-Radzman NA, et al. CEP receptor signalling controls root system architecture in *Arabidopsis* and *Medicago*. *New Phytologist*. 2020;226(6):1809–1821. DOI: 10.1111/nph.16483.
102. Smith S, Zhu S, Joos L, Roberts I, Nikonorova N, Vu LD, et al. The CEP5 peptide promotes abiotic stress tolerance, as revealed by quantitative proteomics, and attenuates the AUX/IAA equilibrium in *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2020;19(8):1248–1262. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001826.
103. Taleski M, Chapman K, Novák O, Schmülling T, Frank M, Djordjevic MA. CEP peptide and cytokinin pathways converge on CEPD glutaredoxins to inhibit root growth. *Nature Communications*. 2023;14:1683. DOI: 10.1038/s41467-023-37282-6.
104. Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, Matsubayashi Y. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science*. 2010;329(5995):1065–1067. DOI: 10.1126/science.1191132.
105. Kaufmann C, Sauter M. Sulfated plant peptide hormones. *Journal of Experimental Botany*. 2019;70(16):4267–4277. DOI: 10.1093/jxb/erz292.

106. Shinohara H, Mori A, Yasue N, Sumida K, Matsubayashi Y. Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*. *PNAS*. 2016;113(14):3897–3902. DOI: 10.1073/pnas.1522639113.
107. Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science*. 2002;296(5572):1470–1472. DOI: 10.1126/science.1069607.
108. Rzemieniewski J, Stegmann M. Regulation of pattern-triggered immunity and growth by phyto cytokines. *Current Opinion in Plant Biology*. 2022;68:102230. DOI: 10.1016/j.pbi.2022.102230.
109. Matsubayashi Y, Sakagami Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *PNAS*. 1996;93(15):7623–7627. DOI: 10.1073/pnas.93.15.7623.
110. Lorbiecke R, Sauter M. Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Science*. 2002;1639(2):321–332. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00101-2.
111. Cheng CY, Krishnakumar V, Chan AP, Thibaud-Nissen F, Schobel S, Town CD. Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant Journal*. 2017;89(4):789–804. DOI: 10.1111/tjp.13415.
112. Wang J, Li H, Han Z, Zhang H, Wang T, Lin G, et al. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature*. 2015;525(7568):265–268. DOI: 10.1038/nature14858.
113. Ladwig F, Dahlke RI, Stührwohldt N, Hartmann J, Harter K, Sauter M, et al. Phytosulfokine regulates growth in *Arabidopsis* through a response module at the plasma membrane that includes cyclic nucleotide-gated channel 17, H⁺-ATPase, and BAK1. *Plant Cell*. 2015;27(6):1718–1729. DOI: 10.1105/tpc.15.00306.
114. Kaufmann C, Motzkus M, Sauter M. Phosphorylation of the phytosulfokine peptide receptor PSKR1 controls receptor activity. *Journal of Experimental Botany*. 2017;68(7):1411–1423. DOI: 10.1093/jxb/erx030.
115. Hartmann J, Fischer C, Dietrich P, Sauter M. Kinase activity and calmodulin binding are essential for growth signaling by the phytosulfokine receptor PSKR1. *Plant Journal*. 2014;78(2):192–202. DOI: 10.1111/tjp.12460.
116. Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Shinohara K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant and Cell Physiology*. 2003;44(12):1412–1416. DOI: 10.1093/pcp/pcg161.
117. Yamakawa S, Sakuta C, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Kamada H, Satoh S. The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. *Journal of Plant Research*. 1998;111:453–458. DOI: 10.1007/BF02507810.
118. Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, Morita A, Sakagami Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiology*. 1999;120(4):1043–1048. DOI: 10.1104/pp.120.4.1043.
119. Zhang H, Hu Z, Lei C, Zheng C, Wang J, Shao S, et al. A plant phytosulfokine peptide initiates auxin-dependent immunity through cytosolic Ca²⁺ signaling in tomato. *Plant Cell*. 2018;30(3):652–667. DOI: 10.1105/tpc.17.00537.
120. Wu T, Kamiya T, Yumoto H, Sotta N, Katsushi Y, Shigenobu S, et al. An *Arabidopsis thaliana* copper-sensitive mutant suggests a role of phytosulfokine in ethylene production. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(13):3657–3667. DOI: 10.1093/jxb/erv105.
121. Stührwohldt N, Dahlke RI, Kutschmar A, Peng X, Sun M-X, Sauter M. Phytosulfokine peptide signaling controls pollen tube growth and funicular pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 2015;153(4):643–653. DOI: 10.1111/ppl.12270.
122. Loivamäki M, Stührwohldt N, Deeken R, Steffens B, Roitsch T, Hedrich R, et al. A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*. 2010;139(4):348–357. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01371.x.
123. Rodiuc N, Barlet X, Hok S, Perfus-Barbeoch L, Allasia V, Engler G, et al. Evolutionarily distant pathogens require the *Arabidopsis* phytosulfokine signalling pathway to establish disease. *Plant, Cell and Environment*. 2016;39(7):1396–1407. DOI: 10.1111/pce.12627.
124. Igarashi D, Tsuda K, Katagiri F. The peptide growth factor, phytosulfokine, attenuates pattern-triggered immunity. *Plant Journal*. 2012;71(2):194–204. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2012.04950.x.
125. Stührwohldt N, Bühler E, Sauter M, Schaller A. Phytosulfokine (PSK) precursor processing by subtilase SBT3.8 and PSK signaling improve drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2021;72(9):3427–3440. DOI: 10.1093/jxb/erab017.
126. Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *PNAS*. 2007;104(46):18333–18338. DOI: 10.1073/pnas.0706403104.
127. Fuglsang AT, Kristensen A, Cuin TA, Schulze WX, Persson J, Thuessen KH, et al. Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *Plant Journal*. 2014;80(6):951–964. DOI: 10.1111/tjp.12680.
128. Mosher S, Seybold H, Rodriguez P, Stahl M, Davies KA, Dayaratne S, et al. The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of *Arabidopsis* to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. *Plant Journal*. 2013;73(3):469–482. DOI: 10.1111/tjp.12050.
129. Ou Y, Lu X, Zi Q, Xun Q, Zhang J, Wu Y, et al. RGF1 insensitive 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Research*. 2016;26:686–698. DOI: 10.1038/cr.2016.63.
130. Fernandez A, Drozdzecki A, Hoogewijs K, Nguyen A, Beeckman T, Madder A, et al. Transcriptional and functional classification of the GOLVEN/root growth factor/CLE-like signaling peptides reveals their role in lateral root and hair formation. *Plant Physiology*. 2013;161(2):954–970. DOI: 10.1104/pp.112.206029.
131. Whitford R, Fernandez A, Tejos R, Pérez Amparo C, Kleine-Vehn J, Vanneste S, et al. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Developmental Cell*. 2012;22(3):678–685. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.02.002.
132. Jeon BW, Kim JS, Oh E, Kang NY, Kim J. Root meristem growth factor 1 (RGF1) – RGF1 insensitive 1 peptide – receptor pair inhibits lateral root development via the MPK6-PUCHI module in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2023;74(5):1475–1488. DOI: 10.1093/jxb/erac495.
133. Doblaz VG, Smakowska-Luzan E, Fujita S, Alassimone J, Barberon M, Madalinski M, et al. Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science*. 2017;355(6322):280–284. DOI: 10.1126/science.aaj1562.
134. Fujita S. Casparian strip integrity factor (CIF) family peptides – regulator of plant extracellular barriers. *Peptides*. 2021;143:170599. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170599.
135. Nakayama T, Shinohara H, Tanaka M, Baba K, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y. A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in *Arabidopsis* roots. *Science*. 2017;355(6322):284–286. DOI: 10.1126/science.aai9057.

136. Okuda S, Fujita S, Moretti A, Hohmann U, Doblas VG, Ma Y, et al. Molecular mechanism for the recognition of sequence-divergent CIF peptides by the plant receptor kinases GSO1/SGN3 and GSO2. *PNAS*. 2020;117(5):2693–2703. DOI: 10.1073/pnas.1911553117.
137. Compaan B, Yang W-C, Bisseling T, Franssen H. ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*–legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant and Soil*. 2001;230(1):1–8. DOI: 10.1023/A:1004687822174.
138. Röhrig H, Schmidt J, Miklashevichs E, Schell J, John M. Soybean *ENOD40* encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *PNAS*. 2002;99(4):1915–1920. DOI: 10.1073/pnas.022664799.
139. Campalans A, Kondorosi A, Crespi M. *Enod40*, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 2004;16(4):1047–1059. DOI: 10.1105/tpc.019406.
140. Kouchi H, Takane K, So RB, Ladha JK, Reddy PM. Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant Journal*. 1999;18(2):121–129. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1999.00432.x.
141. Gulyaev AP, Roussis A. Identification of conserved secondary structures and expansion segments in *enod40* RNAs reveals new *enod40* homologues in plants. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(9):3144–3152. DOI: 10.1093/nar/gkm173.
142. Shafee TMA, Lay FT, Phan TK, Anderson MA, Hulett MD. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(4):663–682. DOI: 10.1007/s00018-016-2344-5.
143. Young ND, Debelle F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, et al. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*. 2011;480(7378):520–524. DOI: 10.1038/nature10625.
144. Downie JA, Kondorosi E. Why should nodule cysteine-rich (NCR) peptides be absent from nodules of some groups of legumes but essential for symbiotic N-fixation in others? *Frontiers in Agronomy*. 2021;3:654576. DOI: 10.3389/fagro.2021.654576.
145. Horvath B, Domonkos A, Kereszt A, Szücs A, Ábrahám E, Ayaydin F, et al. Loss of the nodule-specific cysteine-rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula dnf7* mutant. *PNAS*. 2015;112(49):15232–15237. DOI: 10.1073/pnas.1500777112.
146. Singh J, Valdés-López O. A nodule peptide confiscates haem to promote iron uptake in rhizobia. *Trends in Plant Science*. 2023;28(2):125–127. DOI: 10.1016/j.tplants.2022.11.005.
147. Rychel AL, Peterson KM, Torii KU. Plant twitter: ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. *Journal of Plant Research*. 2010;123:275–280. DOI: 10.1007/s10265-010-0330-9.
148. Hara K, Yokoo T, Kajita R, Onishi T, Yahata S, Peterson KM, et al. Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, epidermal patterning factor 2 in *Arabidopsis* leaves. *Plant and Cell Physiology*. 2009;50(6):1019–1031. DOI: 10.1093/pcp/pcp068.
149. Xiong L, Huang Y, Liu Z, Li C, Yu H, Shahid MQ, et al. Small epidermal patterning factor-like 2 peptides regulate awn development in rice. *Plant Physiology*. 2022;190(1):516–531. DOI: 10.1093/plphys/kiac278.
150. Le J, Zou J, Yang K, Wang M. Signaling to stomatal initiation and cell division. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:297. DOI: 10.3389/fpls.2014.00297.
151. Hunt L, Bailey KJ, Gray JE. The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytologist*. 2010;186(3):609–614. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03200.x.
152. Kosentka PZ, Overholt A, Maradiaga R, Mitoubi O, Shpak ED. EPFL signals in the boundary region of the SAM restrict its size and promote leaf initiation. *Plant Physiology*. 2019;179(1):265–279. DOI: 10.1104/pp.18.00714.
153. Nahimák V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Roveret C. Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signaling and Behavior*. 2012;7(8):1004–1008. DOI: 10.4161/psb.20813.
154. Wigoda N, Ben-Nissan G, Granot D, Schwartz A, Weiss D. The gibberellin-induced, cysteine-rich protein GIP2 from *Petunia hybrida* exhibits *in planta* antioxidant activity. *Plant Journal*. 2006;48(5):796–805. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02917.x.
155. Sun S, Wang H, Yu H, Zhong C, Zhang X, Peng J, et al. GASA14 regulates leaf expansion and abiotic stress resistance by modulating reactive oxygen species accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(6):1637–1647. DOI: 10.1093/jxb/ert021.
156. Silverstein KAT, Moskal WA Jr, Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, et al. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant Journal*. 2007;51(2):262–280. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x.
157. Ahmad MZ, Sana A, Jamil A, Nasir JA, Ahmed S, Hameed MU, et al. A genome-wide approach to the comprehensive analysis of *GASA* gene family in *Glycine max*. *Plant Molecular Biology*. 2019;100(6):607–620. DOI: 10.1007/s11103-019-00883-1.
158. Bouteraa MT, Romdhane WB, Hsouna AB, Amor F, Ebel C, Saad RB, et al. Genome-wide characterization and expression profiling of *GASA* gene family in *Triticum turgidum* ssp. *durum* (Desf.) Husn. (*durum* wheat) unveils its involvement in environmental stress responses. *Phytochemistry*. 2023;206:113544. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113544.
159. Bouteraa MT, Romdhane WB, Baazaoui N, Alfaifi MY, Chouaibi Y, Akacha BB, et al. *GASA* proteins: review of their functions in plant environmental stress tolerance. *Plants*. 2023;12(10):2045. DOI: 10.3390/plants12102045.
160. Qu J, Kang SG, Hah C, Jang J-C. Molecular and cellular characterization of GA-stimulated transcripts GASA4 and GASA6 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 2016;246:1–10. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.01.009.
161. Nagai K, Mori Y, Ishikawa S, Furuta T, Gamuyao R, Niimi Y, et al. Antagonistic regulation of the gibberellic acid response during stem growth in rice. *Nature*. 2020;584(7819):109–114. DOI: 10.1038/s41586-020-2501-8.
162. Butenko MA, Patterson SE, Grini PE, Stenvik G-E, Amundsen SS, Mandal A, et al. *Inflorescence deficient in abscission* controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell*. 2003;15(10):2296–2307. DOI: 10.1105/tpc.014365.
163. Zhu Q, Shao Y, Ge S, Zhang M, Zhang T, Hu X, et al. A MAPK cascade downstream of IDA-HAE/HSL2 ligand-receptor pair in lateral root emergence. *Nature Plants*. 2019;5:414–423. DOI: 10.1038/s41477-019-0396-x.
164. Patharkar OR, Walker JC. Core mechanisms regulating developmentally timed and environmentally triggered abscission. *Plant Physiology*. 2016;172(1):510–520. DOI: 10.1104/pp.16.01004.
165. Mishima M, Takayama S, Sasaki K-I, Jee J-G, Kojima C, Isogai A, et al. Structure of the male determinant factor for *Brassica* self-incompatibility. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(38):36389–36395. DOI: 10.1074/jbc.M305305200.
166. Kemp BP, Doughty J. S cysteine-rich (SCR) binding domain analysis of the *Brassica* self-incompatibility *S*-locus receptor kinase. *New Phytologist*. 2007;175(4):619–629. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02126.x.
167. Ma R, Han Z, Hu Z, Lin G, Gong X, Zhang H, et al. Structural basis for specific self-incompatibility response in *Brassica*. *Cell Research*. 2016;26:1320–1329. DOI: 10.1038/cr.2016.129.

168. Gully K, Pelletier S, Guillou M-C, Ferrand M, Aligon S, Pokotylo I, et al. The SCOOP12 peptide regulates defense response and root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2019;70(4):1349–1365. DOI: 10.1093/jxb/ery454.
169. Rhodes J, Yang H, Moussu S, Boutrot F, Santiago J, Zipfel C. Perception of a divergent family of phyto cytokines by the *Arabidopsis* receptor kinase MIK2. *Nature Communications*. 2021;12:705. DOI: 10.1038/s41467-021-20932-y.
170. Stahl E, Martin AF, Glauser G, Guillou M-C, Aubourg S, Renou J-P, et al. The MIK2/SCOOP signaling system contributes to *Arabidopsis* resistance against herbivory by modulating jasmonate and indole glucosinolate biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:852808. DOI: 10.3389/fpls.2022.852808.
171. Guillou M-C, Vergne E, Aligon S, Pelletier S, Simonneau F, Rolland A, et al. The peptide SCOOP12 acts on reactive oxygen species homeostasis to modulate cell division and elongation in *Arabidopsis* primary root. *Journal of Experimental Botany*. 2022;73(18):6115–6132. DOI: 10.1093/jxb/erac240.
172. Guillou M-C, Balliau T, Vergne E, Canut H, Chourré J, Herrera-León C, et al. The *PROSCOOP10* gene encodes two extracellular hydroxylated peptides and impacts flowering time in *Arabidopsis*. *Plants*. 2022;11:3554. DOI: 10.3390/plants11243554.
173. Chen YL, Lee C-Y, Cheng K-T, Chang W-H, Huang R-N, Nam HG, et al. Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signaling in tomato. *Plant Cell*. 2014;26(10):4135–4148. DOI: 10.1105/tpc.114.131185.
174. Chien PS, Nam HG, Chen Y-R. A salt-regulated peptide derived from the CAP superfamily protein negatively regulates salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(17):5301–5313. DOI: 10.1093/jxb/erv263.

Получена 26.01.2024 / исправлена 29.02.2024 / принята 16.04.2024.
Received 26.01.2024 / revised 29.02.2024 / accepted 16.04.2024.

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЙ ОКСИД ЦИНКА: РОЛЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МАТЕРИАЛА

Ю. М. ГАРМАЗА¹⁾, А. В. ТАМАШЕВСКИЙ¹⁾, Е. И. СЛОБОЖАНИНА^{1), 2), 3)}

¹⁾Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,
Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

³⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. За последние два десятилетия нанотехнологии стали представлять интерес не только для науки, но и для промышленности. Использование нанотехнологических подходов обеспечило возможность получения различных наночастиц и новых материалов на их основе со специфическими свойствами, отличными от свойств микроаналогов. К таким новым материалам можно отнести наноструктурированный оксид цинка, который нашел применение в биомедицинском секторе, включая биовизуализацию и адресную доставку лекарственных средств. Производство частиц в наноразмерном диапазоне позволило значительно увеличить активную площадь поверхности данного типа материалов в занимаемом объеме, что и привело к улучшению их химических, электрических, магнитных, структурных и (или) морфологических свойств. Однако в зависимости от способа проникновения в организм человека наночастицы могут перемещаться в различные органы и ткани, где способны вызывать побочные эффекты. Для проведения токсикологических исследований необходимо смоделировать *in vitro* взаимодействие между наночастицами и клеточными системами *in vivo*, а для возможности соотнесения любых токсических реакций с типом наночастиц требуется выяснить, в какой степени они способны адсорбироваться на клеточной поверхности и проникать внутрь клеток. Известно, что цитотоксичность наноструктурированного оксида цинка также может существенно зависеть от его физико-химических свойств, в частности от размера и формы частиц. По этой причине понимание взаимосвязи между цитотоксичностью и физико-химическими свойствами наночастиц представляется актуальным для объективной оценки возможных рисков от их воздействия. Таким образом, в настоящем обзоре рассмотрены основные механизмы воздействия наноматериалов на организм человека, роль их физико-химических свойств в биологической активности, а также вопросы потенциальной цитотоксичности наноструктурированного оксида цинка.

Образец цитирования:

Гармаза ЮМ, Тамашевский АВ, Слобожанина ЕИ. Наноструктурированный оксид цинка: роль физико-химических свойств в биологической активности и потенциальной цитотоксичности материала. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:24–35.
EDN: HIXMUP

For citation:

Harmaza YM, Tamashevskiy AV, Slobozhanina EI. Nanostructured zinc oxide: role of physico-chemical properties into the biological activity and potential cytotoxicity of the material. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:24–35. Russian.
EDN: HIXMUP

Авторы:

Юлия Михайловна Гармаза – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов.

Александр Владимирович Тамашевский – кандидат биологических наук, докторант лаборатории биотехнологии антител и цитокинов.

Екатерина Ивановна Слобожанина – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, главный научный сотрудник лаборатории производственной трансфузиологии¹⁾, главный научный сотрудник лаборатории медицинской биофизики²⁾, профессор кафедры биохимии биологического факультета³⁾.

Authors:

Yuliya M. Harmaza, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of biotechnology of antibody and cytokines.
garmaza@yandex.ru

Alexander V. Tamashevskiy, PhD (biology); doctoral student at the laboratory of biotechnology of antibody and cytokines.
tayzoe@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8676-2871>

Ekaterina I. Slobozhanina, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor; chief researcher at the laboratory of applied transfusiology^a, chief researcher at the laboratory of medical biophysics^b and professor at the department of biochemistry, faculty of biology^c.

slobozhanina@ibce.by

Ключевые слова: наноструктурированный оксид цинка; физико-химические свойства; биораспределение наночастиц; биологическая активность наноматериалов; цитотоксичность; активные формы кислорода; апоптоз.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б17-128, 2017–2019 гг.) и рамочной программы Европейского союза по науке и инновациям «Горизонт-2020» (подпрограмма Марии Склодовской-Кюри, грант № 778157 (CanBioSe), 2018–2023 гг.).

NANOSTRUCTURED ZINC OXIDE: ROLE OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES INTO THE BIOLOGICAL ACTIVITY AND POTENTIAL CYTOTOXICITY OF THE MATERIAL

Y. M. HARMAZA^a, A. V. TAMASHEVSKI^a, E. I. SLOBOZHANINA^{a, b, c}

^aRepublican Scientific and Practical Centre for Transfusiology and Medical Biotechnology,
160 Dawginawski Tract, Minsk 220053, Belarus

^bInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^cBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: Y. M. Harmaza (garmaza@yandex.ru)

Abstract. Over the past two decades, nanotechnology has become interesting not only for science, but also for industry. Application of nanotechnological approaches has provided opportunities for obtaining various nanoparticles and new materials based on them with specific properties different from the properties of microanalogues. These new materials include nanostructured zinc oxide, which has found application into the biomedical sector, including bioimaging and targeted drug delivery. The production of particles in the nanoscale range has made it possible to increase the active surface area of this type of materials in the occupied volume, which has led to an improvement into their chemical, electrical, magnetic, structural and (or) morphological properties. However, depending on the entry type to the human body, nanoparticles can travel to various organs and tissues, where they can cause side effects. So, it is important *in vitro* to simulate the interaction *in vivo* between nanoparticles and cellular systems for toxicological studies. Moreover, in order to correlate any toxic reactions with the type of nanoparticles, it is necessary to find out the degree of their ability to adsorb on the cell surface and penetrate inside cell. It is known that the cytotoxicity of nanostructured zinc oxide can also significantly depend on its physico-chemical properties, in particular on the size and shape of the particles. For this reason, understanding the relationship between cytotoxicity and the physico-chemical properties of nanoparticles seems relevant for the objective assessment of possible risks associated with their exposure. Thus, the review provides a comprehensive overview of the main mechanisms of nanomaterials action on the human organism, the role of their physico-chemical properties into the biological activity, as well as the questions of potential cytotoxicity of nanostructured zinc oxide.

Keywords: nanostructured zinc oxide; physico-chemical properties; biodistribution of nanoparticles; biological activity of nanomaterials; cytotoxicity; reactive oxygen species; apoptosis.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B17-128, 2017–2019) and the European Union framework programme for research and innovation «Horizon-2020» (Marie Skłodowska-Curie actions, grant No. 778157 (CanBioSe), 2018–2023).

Введение

Научные достижения в области нанотехнологий и в сфере их применения приносят значительную пользу экономике и обществу. По некоторым оценкам, в настоящее время нанотехнологии существенно усилили свое влияние в промышленном секторе, и емкость их рынка составила около 3 трлн долл. США. Причина, по которой инженерные наноматериалы (ИНМ) стали популярными, главным образом заключается в уникальных физико-химических свойствах, обеспечивающих им огромный потенциал для применения в биомедицине [1]. К наноразмерным объектам обычно относят молекулы (0,5 нм), кластеры (1 нм), наночастицы (НЧ) (1–100 нм), коллоидные частицы (3–100 нм), вирусы (100 нм). Как видно, НЧ сопоставимы с молекулами естественного происхождения, при этом они намного меньше, чем бактериальные клетки (10³ нм) или клетки млекопитающих (например, эритроциты и лейкоциты

(около 10^4 нм)). Уменьшение размера частиц до такого уровня значительно увеличивает площадь активной поверхности наноматериалов, что непосредственно приводит к улучшению их химических, электрических, магнитных, структурных и (или) морфологических характеристик. По этой причине наноматериалы часто приобретают свойства, отличные от свойств микроаналогов, и находят широкое применение во многих областях повседневной жизни и в более высокотехнологичных производствах [1; 2].

В зависимости от способа проникновения (через дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт или кожу) НЧ могут распространяться по всему организму либо перемещаться в различные органы и ткани и индуцировать в них побочные эффекты. Для нанотоксикологических исследований особую важность представляет моделирование *in vitro* взаимодействия между НЧ и клеточными системами *in vivo*. Например, для проведения корреляции между типом НЧ и ответом со стороны организма необходимо выяснить, адсорбируются частицы на поверхности клетки или проникают в ее цитоплазматическое пространство [3]. Уникальные физико-химические свойства ИНМ, такие как размер, поверхностная структура, растворимость, форма и агрегатное состояние [4], также являются причиной их всестороннего научного исследования как возможных чужеродных соединений для организма с использованием широкого спектра междисциплинарных подходов – от физико-химических до медико-биологических [1]. Показано, что цитотоксичность различных наноматериалов значительно варьируется в зависимости от их размера и формы [3], что свидетельствует о существенном вкладе в этот процесс именно физико-химических свойств.

Наноструктурированный оксид цинка (ZnO) нашел широкое применение в биомедицинском секторе, включая биовизуализацию и адресную доставку лекарственных средств [1–4]. Кроме того, наноструктуры ZnO являются одним из материалов, используемых для создания иммуносенсоров, за счет их большой площади поверхности и химической стабильности [5; 6]. По этой причине понимание взаимосвязи между биологической активностью, цитотоксичностью и физико-химическими свойствами НЧ ZnO представляется актуальным для объективной оценки потенциальных рисков от их воздействия.

Механизмы воздействия наноматериалов на организм человека и их биораспределение

С ростом коммерциализации ИНМ существенно увеличивается вероятность их воздействия на организм человека. Поскольку токсичность ИНМ, как правило, связана с их распространенностью и инерционностью, эффективной дозой и продолжительностью воздействия, то необходим тщательный систематический анализ влияния этих материалов на человека [7]. В целом НЧ способны вступать в прямой контакт с организмом человека по четырем основным путям, таким как проникновение через кожу, проглатывание, вдыхание и системный вход [8]. Поскольку одежда, лекарственные препараты, косметика и различные средства по уходу за кожей содержат НЧ, их контакт с кожей происходит как преднамеренно, так и случайно. Кроме того, возрастает использование ИНМ в пищевых продуктах (в качестве добавок) и фармацевтических препаратах, в связи с чем люди в развитых странах ежедневно потребляют приблизительно 10^{12} – 10^{14} частиц на человека [7].

Дыхательный тракт – один из основных путей проникновения в человеческий организм НЧ, содержащихся в загрязненной атмосфере. Поступившие через дыхательный тракт НЧ осаждаются во всех областях дыхательных путей: крупные частицы могут быть отфильтрованы в верхних отделах, тогда как более мелкие частицы обнаруживаются в периферических отделах [9]. После поглощения через эпителий легких НЧ попадают в кровь и лимфу, достигая таким образом клеток костного мозга, лимфатических узлов, селезенки, сердца или любого другого органа и даже ганглиев центральной нервной системы [10].

Несмотря на способ поступления НЧ, их распределение в организме сильно зависит от поверхностных характеристик [11], а также от состава, размера и заряда. НЧ достаточно малы, что обуславливает их способность проникать в небольшие капилляры по всему телу и перемещаться через клеточные барьеры, поэтому они могут попадать в цитозоль клетки с помощью различных механизмов и взаимодействовать с субклеточными структурами и органами-мишенями [7]. Соответственно, такие эффекты, как воспаление, окислительный стресс и активация молекулярных клеточных процессов, скорее всего, развиваются не только в органе поступления, но и в органах-мишенях [11].

Известно, что НЧ могут активно проникать в клетки путем фагоцитоза, пиноцитоза, клатринзависимого эндоцитоза, клатрин- и кавеолиннезависимого эндоцитоза или кавеолинопосредованного эндоцитоза [12; 13]. НЧ, интернализированные посредством активного транспорта, обычно переносятся в везикулярные структуры, которые затем сливаются с фаголизосомами или эндосомами. Альтернативно НЧ также могут переноситься в цитозоль, транспортироваться через кавеосомы в эндоплазматический ретикулум либо «пересекать» клетку, используя транцитотические процессы. Помимо активного транспорта, НЧ способны проникать в клетку через плазматическую мембрану путем пассивной диффузии.

Из цитоплазмы они затем могут доставляться к субклеточным компартментам, таким как ядро и митохондрии. Эти уникальные свойства НЧ делают их материалом, подходящим для терапевтического и диагностического применения. Однако при этом они могут попадать в органы-мишени, а именно в центральную нервную систему, которая сильно уязвима для потенциальных неблагоприятных воздействий [14; 15]. Таким образом, чрезвычайно малые размеры НЧ позволяют им проникать в клетки и транспортироваться в их цитозольном пространстве [15], причем разные исследования показали очень быстрый вход наноструктур в клетки крови *in vitro*. Попадание НЧ в клетку, субклеточная локализация и способность катализировать окислительные процессы зависят от химических свойств, размера и формы наноматериала, которые и определяют скорость транспорта ИНМ в клетку.

НЧ могут попасть в ядро посредством транспорта через ядерные поры, путем диффузии через ядерную мембрану или же оказаться в нем случайно в результате того, что ядерная мембрана деградирует во время процесса деления клеток, а затем реорганизуется в каждое дочернее ядро [11]. Этот способ поглощения и свободного движения внутри клетки делает НЧ очень опасными, так как они получают прямой доступ к белкам цитоплазмы и органеллам. В зависимости от локализации внутри клетки НЧ могут обуславливать определенные повреждения клеточных органелл и ДНК как прямо, так и косвенно, взаимодействуя с ДНК-связанными белками. Действительно, исследования *in vivo* и *in vitro* демонстрируют способность наноматериалов вызывать повреждение ДНК [16; 17]. Косвенное повреждение ДНК может происходить без взаимодействия НЧ с молекулой ДНК напрямую, для этого будет достаточно взаимодействия НЧ с белками, участвующими в процессе деления клеток. Кроме того, НЧ способны вызывать различные клеточные реакции, которые, в свою очередь, приводят к генотоксичности, например, через активацию окислительного стресса, воспалительных процессов и (или) аберрантных сигнальных реакций [16]. В ряде работ [18; 19] показана возможность взаимодействия НЧ с клеточными мембранами и продемонстрированы негативные эффекты в отношении их физико-химического состояния. Такое взаимодействие достигается либо за счет адсорбции НЧ на клеточной поверхности, либо за счет нарушения целостности мембраны, что приводит к образованию пор, разжижению мембраны и перекисному окислению липидов [18]. Результатом внезапного увеличения проницаемости внутренней митохондриальной мембраны может стать потеря функции митохондрий и, как следствие, запуск апоптотических и (или) некротических процессов [20]. Наряду с этим НЧ могут проникать в организм человека и взаимодействовать с компонентами иммунной системы, индуцируя воспалительные процессы, аллергические реакции, или оказывать непосредственное влияние на клетки иммунной системы [21]. Это взаимодействие приводит к повышенному высвобождению различных сигнальных молекул иммунной системы, включая цитокины. Однако остается открытым вопрос о том, как именно НЧ ведут себя в клетке и взаимодействуют с ее компонентами.

Роль физико-химических свойств наноматериалов в их биологической активности

Наноразмер – это основная физико-химическая особенность, которая отличает ИНМ от аналогов больших размеров [1]. С уменьшением размера увеличиваются мобильность, возможность транспортировки и доступность частиц в окружающем пространстве. Кроме того, НЧ имеют огромную площадь поверхности по сравнению с такими же образованиями более крупных размеров при условии их сопоставления в одинаковом занимаемом объеме. Этот факт может быть одной из причин, по которым НЧ в итоге оказываются более токсичными, чем частицы больших размеров из того же материала. Другими словами, уменьшение размера частиц напрямую связано с увеличением площади их поверхности (по сравнению с макрочастицами, занимающими тот же объем), что позволяет большему числу их атомов и (или) молекул находиться на поверхности материала, а не внутри него. Соответственно, увеличение площади поверхности определяет потенциальное число реакционноспособных групп на поверхности НЧ, что вполне может привести к повышению биологической активности наноматериала [1; 22].

Другим очень важным физико-химическим фактором, который вносит вклад в поведение и биологические реакции ИНМ, является дисперсионное состояние в системе частиц. Оно определяется отношением количества отдельных частиц в суспензионной среде к количеству агломератов [22; 23]. Как известно, частицы будут стремиться агломерироваться во взвешенном состоянии, если условия для стабильной дисперсии отсутствуют. Эти агломераты могут формироваться благодаря силам притяжения между частицами (например, гидрофобным взаимодействиям, силам Ван-дер-Ваальса) или за счет взаимодействия молекул (например, полимеров, белков, полисахаридов и т. п.) в окружающей среде. Стоит отметить, что чем меньше размер частиц, тем сильнее силы притяжения, которые возникают между ними. Таким образом, частицы могут формировать агрегаты совершенно разных форм и размеров, что также существенно влияет на их свойства и, соответственно, потенциальную токсичность [24].

Как и в случае с размером, частицы в суспензионной среде могут иметь форму, отличную от формы, задаваемой при синтезе (сферической, овальной, кубической, призмной, спиральной и т. п.). Влияние формы наночастиц на их интернализацию рассмотрено в работе [25], где продемонстрировано, что сферические частицы поглощаются клетками в 5 раз эффективнее, чем стержнеобразные частицы аналогичного размера. Подобные выводы были сделаны и авторами настоящей статьи при изучении взаимодействия наноструктурированного ZnO различной формы (стержни и сферические частицы) с периферическими мононуклеарными клетками крови человека [19; 26].

Химические особенности поверхности наноматериала включают широкий спектр свойств, которые способны определять механизм взаимодействия частиц с биомолекулами и биологическими системами. Например, поверхностный заряд НЧ имеет большое значение для индукции биологических эффектов. Он является основным фактором, определяющим дисперсионные свойства частиц и адсорбцию ионов и биомолекул, которые могут влиять на процесс взаимодействия клеток с частицами. Поверхностный заряд твердых частиц оценивается через определение их дзета-потенциала [23; 24].

Различия в физико-химических свойствах НЧ и более крупных частиц определяют их поведение и биораспределение в организме с последующей транслокацией (от попадания в организм до взаимодействия с клеточными структурами) [27]. В то время как большинство эффектов влияния на «первичный» орган (как было сказано выше, чаще всего это дыхательные пути) могут быть одинаковыми для частиц обоих размеров, эффекты влияния на «вторичные» органы (например, кровеносную систему) могут различаться. Таким образом, существенные особенности, которые выделяют НЧ среди более крупных аналогов, – это их потенциальные токсические свойства и необычное биокинетическое поведение.

Наноструктурированный ZnO имеет гексагональную кристаллическую решетку, состоящую из нескольких плоскостей с тетраэдрически скоординированными атомами O^{2-} и Zn^{2+} , расположенными поочередно вдоль оси. Тетраэдрическая координация ZnO обуславливает образование структуры, несимметричной относительно центра симметрии, где каждый анион окружен четырьмя катионами в углах тетраэдра, что приводит к спонтанной поляризации, а также к расходимости в поверхностной энергии [28; 29]. Благодаря уникальным физико-химическим свойствам, таким как высокая химическая стабильность, большой диапазон поглощения излучения и фотостабильность, ZnO является привлекательным ИИМ для широкого применения [29]. Кроме того, в наномасштабе частицы ZnO имеют особые характеристики, а именно высокую изоэлектрическую точку и фотокаталитическую активность.

Благодаря своим фотокаталитическим свойствам НЧ ZnO при попадании в клетку способны повышать содержание активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме, что обуславливает их уникальные антибактериальные свойства. НЧ ZnO имеют положительный поверхностный заряд и поэтому хорошо взаимодействуют с отрицательно заряженными бактериальными мембранами, что облегчает проникновение частиц в клетки и способствует запуску в них апоптотических процессов. Эти особенности позволяют использовать данные наноматериалы в качестве добавок к бактерицидам, применяемым в стоматологии и косметологии [30]. Изоэлектрическая точка НЧ ZnO находится в области pH ~9. При меньших значениях pH частицы ZnO поверхностно протонируются до формы $ZnOH_2^+$, что дает им возможность оставаться положительно заряженными в диапазоне pH, соответствующем физиологическим жидкостям организма (т. е. их можно использовать в качестве носителей лекарственных веществ и т. п.) [5]. Комбинирование фотолуминесцентных свойств НЧ ZnO с антибактериальными открывает многообещающие перспективы для их применения в тераностике [30]. Более 10 лет назад на культуре клеток рака яичников человека OVCAR-3 была продемонстрирована возможность использования ZnO в фотодинамической терапии в сочетании с уже известными противоопухолевыми препаратами [31].

Биологическая активность и потенциальная цитотоксичность наноструктурированного оксида цинка

Известно, что НЧ ZnO проявляют более высокую степень токсичности в ряде типов клеток по сравнению с НЧ оксидов других металлов. Поглощение НЧ клетками, которое, как было сказано выше, зависит от поверхностных свойств наноматериала, является необходимым условием для анализа цитотоксичности, опосредованной НЧ [32]. Чтобы объективно оценить вероятность цитотоксичности НЧ и их провоспалительный потенциал *in vitro*, важно учитывать особенности взаимодействующих типов клеток. В случае с ZnO было показано, что линии опухолевых клеток более восприимчивы к действию данных НЧ, чем здоровые клетки. Кроме того, в ряде работ продемонстрировано, что НЧ ZnO индуцируют селективную цитотоксичность в клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, эпителиальных клетках легких A549, клетках бронхиального эпителия человека BEAS-2B [33]. В свою очередь, цитотоксичность НЧ ZnO не всегда специфична для опухолевых клеток. Например, в работе [34] отмечено, что при инкубации

первичных периферических мононуклеарных клеток крови человека с НЧ ZnO не было обнаружено токсического эффекта, тогда как при их воздействии на моноцитарные дендритные клетки наблюдалась дозозависимая цитотоксическая реакция.

Принимая во внимание усиленную токсичность НЧ ZnO в отношении быстро пролиферирующих плюрипотентных, но недифференцированных клеток независимо от природы их происхождения (опухолевые или обычные), многие нанотоксикологические исследования основываются на использовании стабильных клеточных линий [3; 32; 33]. Это обстоятельство затрудняет сравнительный анализ профилей токсичности НЧ ZnO и экстраполяцию полученных данных для понимания возможных неблагоприятных последствий воздействия НЧ на человека. Однако, учитывая необходимость сокращения использования в исследованиях животных и принимая во внимание значительные видовые различия (например, в строении легких), которые влияют на последующее взаимодействие частиц, именно стабильные клеточные линии чаще всего применяются как модельные системы *in vitro* для анализа цитотоксичности НЧ. При культивировании клеток может происходить осаждение НЧ, что приводит к усилению их контакта с клетками. Этот важный фактор необходимо учитывать при исследовании легочной токсичности, когда взаимодействие НЧ с клетками происходит на границе раздела воздух – жидкость (далее – условия ALI) [35]. Помимо типа клеток, на результаты нанотоксикологических тестов могут влиять физические характеристики НЧ (размер и форма) и окружающая среда. Например, было показано, что взаимодействие НЧ ZnO с фосфатами, присутствующими в клеточной культуральной среде, повышает цитотоксический потенциал частиц [36].

Токсичность НЧ ZnO также может зависеть от концентрации белка в среде для культивирования клеток, что объясняется присоединением белков к поверхности НЧ и ее экранированием (т. е. НЧ способны влиять на вторичные структуры белков). Было показано, что взаимодействие НЧ ZnO с такими белками, как α -лактальбумин (НЧ ZnO диаметром 4–7 нм) или белок ToxR холерного вибриона (НЧ ZnO диаметром ~25 нм), сопровождается модификацией их структуры [37]. В свою очередь, индуцированные НЧ изменения в структуре адсорбированных белков могут влиять на их дальнейшую биореактивность [37]. Однако вопрос о том, как адсорбция белка на поверхности НЧ ZnO влияет на нанотоксические свойства частиц, остается слабоизученным и требует дальнейших исследований. Модификация поверхности НЧ ZnO различными покрытиями также может значительно изменять их цитотоксический потенциал [32]. Из-за большой величины отношения площади поверхности НЧ к их массе они обладают поверхностной реактивностью и по сравнению с более крупными частицами могут вызывать чрезмерное повреждение клеток [38]. Авторы работы [39] предположили, что существует критический размер, от которого зависит цитотоксичность НЧ ZnO. Но имеющегося количества информации в поддержку этой гипотезы пока недостаточно. Например, было показано, что НЧ ZnO (~100 нм) сильно влияют на фагоцитарную активность клеток острой моноцитарной лейкемии человека THP-1 по сравнению с микроразмерными частицами ZnO (5 мкм) [40].

Интересным фактом является влияние формы НЧ ZnO на их цитотоксический потенциал. Так, в работе [39] продемонстрировано, что сферические НЧ ZnO (диаметр 10–30 нм) проявляют более сильную цитотоксичность в отношении клеточной линии мышинных макрофагов Apa-1 по сравнению с наностержнями ZnO. В статье [26] на основе сравнительной оценки молекулярного действия двух различных форм НЧ ZnO на клетки также был сделан вывод о более сильном цитотоксическом эффекте именно у сферических частиц.

При изучении токсичности аэрозольных НЧ ZnO в клетках A549, культивируемых в условиях ALI, которые имитируют сложный характер среды легких *in vivo*, была выявлена активация экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-6 и GM-CSF) без влияния на цитотоксичность по сравнению с теми же клетками, культивируемыми в водных условиях. Но подобный эффект не наблюдался для генов, ассоциированных с окислительным стрессом (например, генов, кодирующих гемоксигеназу 1-го типа и супероксиддисмутазу 2-го типа). Таким образом, авторы показали, что субкультуры в условиях ALI могут давать меньше ложноотрицательных результатов при изучении иммунотоксичности, чем клетки, погруженные в культуральную среду [41]. Вместе с тем было обнаружено развитие окислительного стресса в клетках A549, культивируемых в условиях ALI и не погруженных в воду, при воздействии аэрозольных НЧ ZnO. Однако подобные эффекты регистрировались при высоких концентрациях НЧ ZnO, приводящих к нарушению целостности клеточных мембран и высвобождению лактатдегидрогеназы [42]. Возможно, степень взаимодействия НЧ ZnO с клетками, культивируемыми в условиях ALI или в условиях погружения, может отличаться, если учитывать динамику растворения НЧ ZnO и их последующее взаимодействие с клеткой. После воздействия НЧ ZnO у субкультур в условиях ALI было зарегистрировано значительно более низкое содержание внутриклеточных ионов цинка (в 3 раза меньше) по сравнению с погруженными эпителиальными клетками мыши C10. Кроме того, показано, что количество ионов цинка в клетках, культивируемых в условиях ALI, увеличилось через 3 ч инкубации,

а в погруженных клетках постоянно росло с течением времени. Для объяснения разницы в уровнях внутриклеточной концентрации ионов цинка была предложена гипотеза о динамике осаждения НЧ ZnO на поверхности клеток [43].

Оценка цитотоксичности НЧ ZnO может быть сложной задачей, так как они могут растворяться в цитозоле и высвобождать ионы (*shedding-effect*), которые сами по себе способны нарушать функционирование многих внутриклеточных компонентов. Проведенные к настоящему времени исследования демонстрируют, что, по-видимому, сразу несколько факторов вносят вклад в цитотоксический потенциал НЧ ZnO. К этим факторам относятся физико-химические характеристики самих НЧ, первичные иммунные ответы взаимодействующих клеток, а также условия культивирования, включая компоненты питательных сред [31–43].

В последнее время опосредованная НЧ ZnO цитотоксичность изучается во многих лабораториях как *in vivo*, так и *in vitro* на различных клетках и клеточных линиях млекопитающих [44]. Анализ литературы показал, что к ключевым факторам, обуславливающим цитотоксичность НЧ ZnO, можно отнести: 1) вне- и внутриклеточное растворение НЧ; 2) дисбаланс клеточного редокс-статуса, вызывающий накопление АФК; 3) запуск процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза). Кратко рассмотрим каждый из этих факторов.

Цитотоксичность НЧ ZnO, связанная с их растворением. Растворение НЧ ZnO считается одной из основных причин их цитотоксичности. Интересно, что в то время как одни исследователи предполагают, что внеклеточное растворение НЧ ZnO ответственно за цитотоксичность, другие ученые демонстрируют, что долго продолжающееся поглощение НЧ ZnO клетками и последующее их растворение в лизосомах приводят к повышению цитозольного уровня ионов цинка, которое впоследствии индуцирует цитотоксичность [44]. Поглощение ионов Zn^{2+} , высвобожденных из НЧ и растворенных во внеклеточной среде, скорее всего, происходит через цинковые транспортеры семейства ZIP, локализованные на поверхности мембран, а далее клетки локализуют эти избыточные ионы внутри везикул, известных как цинкосомы [45].

Рентгенофлуоресцентный анализ и сканирующая электронная микроскопия выявили 200-кратное увеличение концентрации ионов цинка в клетках, обработанных НЧ ZnO [46]. Однако в клетках, проинкубированных с соответствующими концентрациями $ZnCl_2$, содержание свободных ионов цинка было значительно выше [26]. Избыток ионов цинка в клеточной культуральной среде из-за растворения НЧ ZnO может привести к потере целостности клеточной мембраны, высвобождению цитозольной лактатдегидрогеназы и последующей гибели клеток по пути апоптоза. Установлено, что внеклеточное растворение НЧ ZnO (~30 % при самой высокой тестируемой концентрации) в культуральной среде индуцирует нефротоксичность в гломерулярных и тубулярных клетках почки человека [47]. Авторы работы [48] показали, что НЧ ZnO способны индуцировать цитотоксичность только при прямом воздействии на моноциты. Возможным объяснением этих противоречивых результатов является образование плохо растворимого аморфного цинк-карбонат-фосфатного наноразмерного осадка, который способен защитить клетки от токсического воздействия внеклеточных ионов цинка [36].

Обнаруженная сверхэкспрессия генов металлотионеинов в клетках связана с хелатированием ионов металлов и, следовательно, с запуском механизмов детоксикации [45]. Воздействие НЧ ZnO на моноцитарные дендритные клетки, моноцитарные макрофаги человека и клеточную линию Т-лимфобластной лейкемии человека Jurkat приводило к усилению активности общих генов металлотионеинов, доказывая, что НЧ ZnO являются источниками ионов цинка, принимающих участие в клеточном метаболизме [49]. Аналогичное наблюдение было сделано, когда клеточная линия легких человека L-132 подвергалась воздействию НЧ ZnO (диаметр ~50 нм) в течение 24 ч, но профиль растворения изученных НЧ ZnO при этом не исследовался [50]. Учитывая относительную нестабильность НЧ ZnO при низких значениях pH, кислое микроокружение опухолевых клеток способствует внеклеточному растворению НЧ ZnO (~100 % после воздействия в течение 24 ч при pH 4–6), что может привести к накоплению АФК, разрушению митохондриальных мембран и остановке клеточного цикла [51]. Этим можно объяснить более высокую цитотоксичность НЧ ZnO в отношении раковых клеточных линий, о чем сообщалось ранее [44].

Дисперсная природа НЧ ZnO играет важную роль в итоговой цитотоксичности. Хотя растворение НЧ ZnO является предпосылкой для их цитотоксичности, в настоящее время нет единого мнения относительно предпочтительного места растворения НЧ ZnO (внутри или вне клетки). Кроме того, пока неясно, почему различаются механизмы, опосредующие цитотоксичность, которая индуцирована ионами цинка, высвобожденными из нано- и микрочастиц ZnO. Считается, что аналитические методы часто переоценивают количество ионов цинка, высвободившихся из НЧ в культуральную среду, и общий вклад таких ионов в итоговую цитотоксичность НЧ составляет лишь около 10 % [52].

Следует отметить, что результаты исследования цитотоксичности НЧ сильно варьируют при использовании разных типов клеток из-за различия в механизмах клеточного поглощения, и поэтому количество НЧ, напрямую взаимодействующих с клетками, также будет разным. Модификация поверхности НЧ ZnO различными покрытиями для изменения характеристик растворения может снизить их токсичность. Было установлено, что оболочка из оксида титана, покрывающая НЧ ZnO, уменьшает скорость высвобождения ионов цинка при взаимодействии с клетками [53], в результате чего снижается итоговая цитотоксичность НЧ как вне клетки, так и внутри нее. В качестве альтернативного подхода можно предложить модифицировать поверхностные свойства НЧ ZnO таким образом, чтобы усилить их поглощение клетками, не изменяя при этом скорость растворения наноматериала внутри клетки [54]. Следовательно, новые подходы, направленные на изучение растворения НЧ ZnO, могут помочь повысить биобезопасность использования этих наноматериалов в биомедицинских приложениях.

Цитотоксичность НЧ ZnO, связанная с накоплением АФК в клетках. АФК, такие как гидроксильные, супероксидные радикалы и перекись водорода, являются реакционноспособными молекулами, состоящими из анионсодержащих атомов кислорода. Нарушение окислительно-восстановительного баланса клеток может быть вызвано снижением выработки антиоксидантов или изменением их способности восстанавливать окислительные повреждения. Следствием этих процессов в клетках становится активация сигнальных каскадов, приводящая в итоге к цитотоксичности. В работе [55] была предложена иерархическая модель развития окислительного стресса для дальнейшего объяснения повреждений клетки, опосредованных НЧ. В этой модели реакция 1-го уровня характеризуется усилением активности антиоксидантных систем, за ней следует реакция 2-го уровня, включающая активацию сигнальных путей NF-κB (семейство транскрипционных факторов) или MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа) и запускающая реакцию 3-го уровня, которая приводит к гибели клеток по пути апоптоза. Исходя из анализа литературных данных, был выдвинут постулат о ZnO-индуцированном повышении содержания АФК в различных типах клеток. Показано, что мощная антиоксидантная активность клеток BEAS-2B после предварительной инкубации с H₂O₂ помогла им лучше переносить воздействие НЧ ZnO [56]. Этот результат свидетельствует об эссенциальной роли поддержания клеточного окислительно-восстановительного баланса в физиологическом диапазоне в процессе выживания клеток при воздействии НЧ ZnO. Чтобы понять, опосредовано образование АФК воздействием НЧ ZnO или же их цитотоксичностью, авторы работы [57] изучили способность клеточной линии A549 проявлять антиоксидантный ответ после воздействия субцитотоксической концентрации НЧ ZnO. О наличии ответа свидетельствовало повышенное содержание маркера окислительно-восстановительных процессов – гемоксигеназы-1. Максимум его концентрации был достигнут через 6 ч после воздействия НЧ ZnO, при этом базальный уровень наблюдался уже спустя 24 ч после воздействия. Было высказано предположение о том, что наличие избытка ионов цинка в клетках при воздействии НЧ ZnO может вызывать нарушение равновесия в Zn-зависимой активности данного белка за счет инактивации клеточных окислительно-восстановительных систем, которое и приводит в дальнейшем к гибели клеток. Показано, что чрезмерная экспрессия такого антиоксидантного фермента, как микросомальная глутатион-S-трансфераза-1, не способствует снижению цитотоксичности в клетках рака молочной железы человека MCF-7, подвергшихся воздействию НЧ ZnO. Этот результат мог быть связан с прямым ингибированием данного фермента растворенными ионами цинка [58].

Таким образом, воздействие НЧ ZnO нарушает внутриклеточный гомеостаз ионов цинка, что приводит к повышению содержания АФК. В свою очередь, смещение клеточного окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей индуцирует наблюдаемые токсические эффекты НЧ ZnO, включая рост концентрации провоспалительных маркеров, инициацию процессов окислительного стресса и активацию апоптотических сигнальных путей, приводящих в дальнейшем к клеточной гибели.

Цитотоксичность НЧ ZnO, связанная с запуском апоптоза. Помимо того, что митохондрии являются основными энергетическими органеллами клетки, они также участвуют в регуляции ее сигнальных путей, которые управляют процессами апоптоза. Деполяризация митохондриальной мембраны ИММ может вызвать гибель клеток, как было показано на примере клеток аденокарциномы легких человека H1355, подвергшихся воздействию НЧ ZnO [59]. Характерные особенности клеток, в которых запущен процесс апоптоза, включают физические изменения в цитоплазме, плазматической мембране и ядре. Отмечено, что НЧ ZnO при взаимодействии с клетками *in vitro* индуцируют несколько сигнальных путей, которые и приводят к апоптотической гибели клеток. При этом установлено, что именно сигнальные пути p53 и p38 вовлечены в апоптотическую гибель клеток, индуцированную НЧ ZnO. Авторы работ [60; 61] продемонстрировали повышенную активность проапоптотических генов каспазы-3, белка Вах и белка p53, выполняющего функцию опухолевого супрессора, наряду с фрагментацией ДНК для клеток HepG2 и дермальных фибробластов человека, обработанных НЧ ZnO. Недавнее исследование, проведенное на

ганглиозных клетках сетчатки глаза крысы RCG-5, показало, что увеличение содержания АФК приводит к сверхэкспрессии каспазы-12, активации окислительного стресса в эндоплазматическом ретикулуме и, соответственно, гибели клеток [62]. Было отмечено, что NOX2-фагоцитарный ферментный комплекс НАДФН-оксидазы является основным источником образования АФК и индукции апоптоза и (или) некроза. Известные редокс-чувствительные пути, такие как каскад Nrf2 (антиоксидантный транскрипционный ядерный фактор, связанный с эритроидом-2), могут способствовать цитотоксичности макрофагов [63]. Недавнее исследование действия НЧ ZnO на культуру первичных астроцитов крысы подтвердило роль сигнального пути JNK (N-концевая киназа c-Jun) в развитии апоптоза [64].

Альтернативным апоптотическим механизмом клеточной гибели является аутофагия, при которой клетка выживает, но ее компоненты доставляются внутрь везикул, называемых аутофагосомами. В конечном итоге они сливаются с лизосомами, что приводит к разрушению инкапсулированного материала [65]. Показано, что воздействие НЧ ZnO на клетки эпидермиса мыши способствует образованию аутофагической вакуоли с последующей митохондриальной дисфункцией и гибелью клеток [66]. Тем не менее примечательно, что для лейкозных Т-клеток человека воздействие НЧ ZnO инициировало альтернативный путь апоптоза, независимый от каспаз и неопосредованный АФК [67].

Под генотоксичностью, обусловленной НЧ, обычно понимают повреждение клеточной ДНК, которое может происходить либо непосредственно (из-за взаимодействия НЧ с ядерным материалом), либо косвенно (из-за повышения содержания АФК, других реактивных ионов или механического повреждения). Механизмы повреждения ДНК могут быть неактивны или даже снижены при взаимодействии клеток с НЧ ZnO, что объясняется генотоксическим потенциалом этих НЧ. Показано, что НЧ ZnO в концентрации 5 мкг/мл вызывают значительное повреждение ДНК, о чем свидетельствует увеличение момента хвоста кометы (метод ДНК-комет) в клетках эпидермиса человека А431 [68]. Схожие результаты получены и для эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек человека НК-2 [69]. Также было продемонстрировано концентрационнозависимое окислительное повреждение ДНК, приводящее к ядерной конденсации, фрагментации ДНК, образованию в ней гиподиплоидных ядер и апоптотических телец при обработке макрофагов НЧ ZnO [63]. В качестве возможного объяснения генотоксичности предложено внутриядерное распределение НЧ ZnO, которое наблюдалось в клетках плоскоклеточного рака головы и шеи человека [70]. Однако до настоящего времени нет полного понимания механизма повреждения ДНК НЧ ZnO, а в клетках ТНР-1, подвергшихся воздействию нано- или микрочастиц ZnO, вообще не было выявлено признаков генотоксического повреждения. Данный результат можно объяснить размером частиц нанопорошка ZnO, который использовали исследователи (он превышал 100 нм) [48; 49]. Так, например, обработка клеток фибробластов легких китайского хомяка СНЛ положительно или отрицательно заряженными НЧ ZnO размером 20 или 70 нм не приводила к индуцированию кластогенного эффекта (включая генотоксичность *in vivo*) [71].

В связи с широким использованием НЧ ZnO в качестве УФ-фильтров в солнцезащитной косметике крайне актуальным представляется исследование влияния УФ-излучения на генотоксичность НЧ ZnO. Авторы работы [72] показали, что в клетках эмбриональной почки человека НЕК293 и эмбриональных фибробластов мыши НИН/ЗТЗ, подвергнутых воздействию НЧ ZnO в концентрации 100 мкг/мл, происходит повреждение ДНК, хотя после воздействия УФ-В-излучения (280–315 нм) на клетки, проинкубированные с НЧ, наблюдалось значительное снижение генотоксического потенциала. Совместное воздействие НЧ ZnO и УФ-А-излучения (315–400 нм) на клетки ТНР-1 приводило к накоплению в них такого же количества АФК, как при воздействии УФ-А-излучения в отсутствие НЧ, что указывает на минимальное участие НЧ ZnO в индукции повреждений в данных клетках [73].

Заключение

Таким образом, многочисленные исследования токсичности НЧ ZnO указывают на их реактивную природу. Цитотоксические реакции НЧ ZnO могут в значительной степени зависеть от типа исследуемой клетки, условий и времени воздействия, а также способа получения НЧ ZnO, обуславливающего их основные физико-химические характеристики. Стоит отметить, что наличие покрытий и (или) ионных примесей в НЧ ZnO наряду с присутствием в среде инкубации белков и (или) фосфатов также может влиять на общий цитотоксический потенциал частиц. Растворение НЧ ZnO вне клеток либо внутри их лизосомального компартмента приводит к нарушению клеточного гомеостаза ионов цинка, что впоследствии индуцирует накопление АФК.

Недавние исследования также продемонстрировали склонность НЧ ZnO к взаимодействию со специфическими рецепторными молекулами на поверхности клеток, что обуславливает влияние на транскрипцию провоспалительных цитокинов через определенные сигнальные пути. Помимо иммуномодуляции, воздействие НЧ ZnO *in vitro* может приводить к аутофагии, генотоксичности и апоптозу в различных

типах клеток. Воздействие НЧ ZnO *in vivo* по пероральному, интратрахеальному или ингаляционному пути способствует их накоплению в жизненно важных органах, таких как печень, почки, сердце и легкие, что сопряжено с токсическими и (или) воспалительными последствиями. Исследования *in vitro* широкого диапазона концентраций НЧ ZnO могут помочь расширить существующие токсикологические представления об этом наноматериале. Детальное понимание цитотоксического и воспалительного потенциала НЧ ZnO лежит в основе всестороннего изучения возможности их дальнейшего применения в биомедицинском секторе.

Библиографические ссылки / References

1. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622–627. DOI: 10.1126/science.1114397.
2. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010;7(9):1063–1077. DOI: 10.1517/17425247.2010.502560.
3. Wiesmann N, Tremel W, Brieger J. Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(23):4973–4989. DOI: 10.1039/d0tb00739k.
4. Czyżowska A, Barbasz A. A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies? *International Journal of Environmental Health Research*. 2022;32(4):885–901. DOI: 10.1080/09603123.2020.1805415.
5. Tamashevski A, Harmaza Y, Viter R, Jevdokimovs D, Poplauskis R, Slobozhanina E, et al. Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells. *Talanta*. 2019;200:378–386. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.03.064.
6. Tamashevski A, Harmaza Y, Slobozhanina E, Viter R, Iatsunskyi I. Photoluminescent detection of human T-lymphoblastic cells by ZnO nanorods. *Molecules*. 2020;25(14):3168. DOI: 10.3390/molecules25143168.
7. Yoshioka Y, Higashisaka K, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The absorption, distribution, metabolism, and excretion profile of nanoparticles. In: Akashi M, Akagi T, Matsusaki M, editors. *Engineered cell manipulation for biomedical application*. Tokyo: Springer; 2014. p. 259–271 (Zucolotto V, editor. Nanomedicine and nanotoxicology). DOI: 10.1007/978-4-431-55139-3_15.
8. Martirosyan A, Schneider Y-J. Engineered nanomaterials in food: implications for food safety and consumer health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014;11(6):5720–5750. DOI: 10.3390/ijerph110605720.
9. Keerthana S, Kumar A. Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. *Critical Reviews in Toxicology*. 2020;50(1):47–71. DOI: 10.1080/10408444.2020.1726282.
10. Boyes WK, van Thriel C. Neurotoxicology of nanomaterials. *Chemical Research in Toxicology*. 2020;33(5):1121–1144. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00050.
11. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*. 2004;2:12. DOI: 10.1186/1477-3155-2-12.
12. Patel S, Kim J, Herrera M, Mukherjee A, Kabanov AV, Sahay G. Brief update on endocytosis of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;144:90–111. DOI: 10.1016/j.addr.2019.08.004.
13. Chen W, D'Argenio DZ, Sipos A, Kim K-J, Crandall ED. Biokinetic modeling of nanoparticle interactions with lung alveolar epithelial cells: uptake, intracellular processing, and egress. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2021;320(1):R36–R43. DOI: 10.1152/ajpregu.00184.2020.
14. Means N, Elechalawar CK, Chen WR, Bhattacharya R, Mukherjee P. Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Molecular Aspects of Medicine*. 2022;83:100993. DOI: 10.1016/j.mam.2021.100993.
15. Shende P, Wakade VS. Biointerface: a nano-modulated way for biological transportation. *Journal of Drug Targeting*. 2020;28(5):456–467. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1720218.
16. Landsiedel R, Honarvar N, Seiffert SB, Oesch B, Oesch F. Genotoxicity testing of nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2022;14(6):e1833. DOI: 10.1002/wnan.1833.
17. Yao Yongshuai, Zhang Ting, Tang Meng. The DNA damage potential of quantum dots: toxicity, mechanism and challenge. *Environmental Pollution*. 2023;317:120676. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120676.
18. Mandal P, Ghosh SK. Graphene-based nanomaterials and their interactions with lipid membranes. *Langmuir*. 2023;39(51):18713–18729. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c02805.
19. Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. Membrane effects of zinc oxide nanorods and nanoparticles in human lymphocytes. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2019;63(1):72–78. Russian. DOI: 10.29235/1561-8323-2019-63-1-72-78.
20. Wu Daming, Ma Ying, Cao Yuna, Zhang Ting. Mitochondrial toxicity of nanomaterials. *Science of the Total Environment*. 2020;702:134994. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134994.
21. Aljabali AA, Obeid MA, Bashatwah RM, Serrano-Aroca Á, Mishra V, Mishra Y, et al. Nanomaterials and their impact on the immune system. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2008. DOI: 10.3390/ijms24032008.
22. Mukherjee B, Maji R, Roychowdhury S, Ghosh S. Toxicological concerns of engineered nanosize drug delivery systems. *American Journal of Therapeutics*. 2016;23(1):e139–e150. DOI: 10.1097/01.mjt.0000433947.16654.75.
23. Domb AJ, Sharifzadeh G, Nahum V, Hosseinkhani H. Safety evaluation of nanotechnology products. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1615. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101615.
24. Sayes CM, Warheit DB. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2009;1(6):660–670. DOI: 10.1002/wnan.58.
25. Sabourian P, Yazdani G, Ashraf SS, Frounchi M, Mashayekhan S, Kiani S, et al. Effect of physico-chemical properties of nanoparticles on their intracellular uptake. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8019. DOI: 10.3390/ijms21218019.
26. Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. Molecular nature of cytotoxicity of zinc oxide nanostructures. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2020;64(4):448–456. Russian. DOI: 10.29235/1561-8323-2020-64-4-448-456.
27. Zielińska A, Costa B, Ferreira MV, Miguéis D, Louros JMS, Durazzo A, et al. Nanotoxicology and nanosafety: safety-by-design and testing at a glance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(13):4657. DOI: 10.3390/ijerph17134657.

28. Verma HK, Vij M, Maurya KK. Synthesis, characterization and sun light-driven photocatalytic activity of zinc oxide nanostructures. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2020;20(6):3683–3692. DOI: 10.1166/jnn.2020.17679.
29. Jha S, Rani R, Singh S. Biogenic zinc oxide nanoparticles and their biomedical applications: a review. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2023;33(6):1437–1452. DOI: 10.1007/s10904-023-02550-x.
30. Yi Caixia, Yu Zhihai, Ren Qian, Liu Xian, Wang Yan, Sun Xin, et al. Nanoscale ZnO-based photosensitizers for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2020;30:101694. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101694.
31. Li Jingyuan, Guo Dadong, Wang Xuemei, Wang Huangping, Jiang Hui, Chen Baoan. The photodynamic effect of different size ZnO nanoparticles on cancer cell proliferation *in vitro*. *Nanoscale Research Letters*. 2010;5(6):1063–1071. DOI: 10.1007/s11671-010-9603-4.
32. Fujihara J, Nishimoto N. Review of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, tissue distribution for various exposure routes, toxicological effects, toxicity mechanism in mammals, and an approach for toxicity reduction. *Biological Trace Element Research*. 2024;202(1):9–23. DOI: 10.1007/s12011-023-03644-w.
33. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:845–857. DOI: 10.2147/IJN.S29129.
34. Andersson-Willman B, Gehrman U, Cansu Z, Buerki-Thurnherr T, Krug HF, Gabrielsson S, et al. Effects of subtoxic concentrations of TiO₂ and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;264(1):94–103. DOI: 10.1016/j.taap.2012.07.021.
35. Lovén K, Dobric J, Bölükbas DA, Käredal M, Tas S, Rissler J, et al. Toxicological effects of zinc oxide nanoparticle exposure: an *in vitro* comparison between dry aerosol air – liquid interface and submerged exposure systems. *Nanotoxicology*. 2021;15(4):494–510. DOI: 10.1080/17435390.2021.1884301.
36. Everett WN, Chen C, Sun D, McMahon RE, Zhang X, Chen WJA, et al. Phosphate-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and agglomerates. *Toxicology Letters*. 2014;225(1):177–184. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.12.005.
37. Bardhan M, Mandal G, Ganguly T. Steady state, time resolved, and circular dichroism spectroscopic studies to reveal the nature of interactions of zinc oxide nanoparticles with transport protein bovine serum albumin and to monitor the possible protein conformational changes. *Journal of Applied Physics*. 2009;106(3):034701. DOI: 10.1063/1.3190483.
38. Babayevska N, Przysiecka L, Iatsunskyi I, Nowaczyk G, Jarek M, Janiszewska E, et al. ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Scientific Reports*. 2022;12:8148. DOI: 10.1038/s41598-022-12134-3.
39. Song Wenhua, Zhang Jinyang, Guo Jing, Zhang Jinhua, Ding Feng, Li Liying, et al. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters*. 2010;199(3):389–397. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.10.003.
40. Li Xianqiang, Fang Xin, Ding Yanhuai, Li Juan, Cao Yi. Toxicity of ZnO nanoparticles (NPs) with or without hydrophobic surface coating to THP-1 macrophages: interactions with BSA or oleate-BSA. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2018;28(7):520–528. DOI: 10.1080/15376516.2018.1469708.
41. Bengalli R, Gualtieri M, Capasso L, Urani C, Camatini M. Impact of zinc oxide nanoparticles on an *in vitro* model of the human air-blood barrier. *Toxicology Letters*. 2017;279:22–32. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.07.877.
42. Xie Y, Williams NG, Tolic A, Chrisler WB, Teeguarden JG, Maddux BLS, et al. Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air – liquid interface. *Toxicological Sciences*. 2012;125(2):450–461. DOI: 10.1093/toxsci/kfr251.
43. Mihai C, Chrisler WB, Xie Y, Hu D, Szymanski CJ, Tolic A, et al. Intracellular accumulation dynamics and fate of zinc ions in alveolar epithelial cells exposed to airborne ZnO nanoparticles at the air – liquid interface. *Nanotoxicology*. 2015;9(1):9–22. DOI: 10.3109/17435390.2013.859319.
44. Pei Xingyao, Jiang Haiyang, Xu Gang, Li Cun, Li Daowen, Tang Shusheng. Lethality of zinc oxide nanoparticles surpasses conventional zinc oxide via oxidative stress, mitochondrial damage and calcium overload: a comparative hepatotoxicity study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(12):6724. DOI: 10.3390/ijms23126724.
45. Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. The role of metallothioneins in maintenance of zinc homeostasis and redox state in erythrocytes of cardiologic patients with metabolic syndrome. *Journal of Integrated OMICS*. 2019;9(1):260. DOI: 10.5584/jiomics.v9i1.260.
46. James SA, Feltis BN, de Jonge MD, Sridhar M, Kimpton JA, Altissimo M, et al. Quantification of ZnO nanoparticle uptake, distribution, and dissolution within individual human macrophages. *ACS Nano*. 2013;7(12):10621–10635. DOI: 10.1021/nn403118u.
47. Iavicoli I, Fontana L, Nordberg G. The effects of nanoparticles on the renal system. *Critical Reviews in Toxicology*. 2016;46(6):490–560. DOI: 10.1080/10408444.2016.1181047.
48. Shen C, James SA, de Jonge MD, Turney TW, Wright PFA, Feltis BN. Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicological Sciences*. 2013;136(1):120–130. DOI: 10.1093/toxsci/kft187.
49. Tuomela S, Autio R, Buerki-Thurnherr T, Arslan O, Kunzmann A, Andersson-Willman B, et al. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One*. 2013;8(7):e68415. DOI: 10.1371/journal.pone.0068415.
50. Elfsmark L, Ekstrand-Hammarström B, Forsgren N, Lejon C, Hägglund L, Wingfors H. Characterization of toxicological effects of complex nano-sized metal particles using *in vitro* human cell and whole blood model systems. *Journal of Applied Toxicology*. 2022;42(2):203–215. DOI: 10.1002/jat.4202.
51. Sasidharan A, Chandran P, Menon D, Raman S, Nair S, Koyakutty M. Rapid dissolution of ZnO nanocrystals in acidic cancer microenvironment leading to preferential apoptosis. *Nanoscale*. 2011;3(9):3657–3669. DOI: 10.1039/c1nr10272a.
52. Mu Yunsong, Wu Fengchang, Zhao Qing, Ji Rong, Qie Yu, Zhou Yue, et al. Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1207–1214. DOI: 10.1080/17435390.2016.1202352.
53. Hsiao I-Lun, Huang Yuh-Jeen. Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*. 2011;24(3):303–313. DOI: 10.1021/tx1001892.
54. Luo M, Shen C, Feltis BN, Martin LL, Hughes AE, Wright PFA, et al. Reducing ZnO nanoparticle cytotoxicity by surface modification. *Nanoscale*. 2014;6(11):5791–5798. DOI: 10.1039/c4nr00458b.
55. Xia T, Kovoichich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*. 2008;2(10):2121–2134. DOI: 10.1021/nr800511k.

56. Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FYC, Loo JSC. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(6):1762–1766. DOI: 10.1016/j.fct.2010.04.023.
57. Saptarshi SR, Feltis BN, Wright PFA, Lopata AL. Investigating the immunomodulatory nature of zinc oxide nanoparticles at sub-cytotoxic levels *in vitro* and after intranasal instillation *in vivo*. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015;13:6. DOI: 10.1186/s12951-015-0067-7.
58. Shi J, Karlsson HL, Johansson K, Gogvadze V, Xiao L, Li J, et al. Microsomal glutathione transferase 1 protects against toxicity induced by silica nanoparticles but not by zinc oxide nanoparticles. *ACS Nano*. 2012;6(3):1925–1938. DOI: 10.1021/nm2021056.
59. Kao Yi-Yun, Chen Yi-Chun, Cheng Tsun-Jen, Chiung Yin-Mei, Liu Pei-Shan. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicological Sciences*. 2012;125(2):462–472. DOI: 10.1093/toxsci/kfr319.
60. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*. 2012;17(8):852–870. DOI: 10.1007/s10495-012-0705-6.
61. Meyer K, Rajanahalli P, Ahamed M, Rowe JJ, Hong Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology in Vitro*. 2011;25(8):1721–1726. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.08.011.
62. Guo Dadong, Bi Hongsheng, Liu Bing, Wu Qiuxin, Wang Daoguang, Cui Yan. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicology in Vitro*. 2013;27(2):731–738. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.12.001.
63. Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, et al. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One*. 2013;8(6):e65704. DOI: 10.1371/journal.pone.0065704.
64. Wang Jieting, Deng Xiaobei, Zhang Fang, Chen Deliang, Ding Wenjun. ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9:117. DOI: 10.1186/1556-276X-9-117.
65. Uzhytchak M, Smolková B, Lunova M, Frtůs A, Jirsa M, Dejneka A, et al. Lysosomal nanotoxicity: impact of nanomedicines on lysosomal function. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023;197:114828. DOI: 10.1016/j.addr.2023.114828.
66. Kim Boyun, Kim Gaeun, Jeon Soyeon, Cho Wan-Seob, Jeon Hyun Pyo, Jung Jewon. Zinc oxide nanoparticles trigger autophagy-mediated cell death through activating lysosomal TRPML1 in normal kidney cells. *Toxicology Reports*. 2023;10:529–536. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.04.012.
67. Buerki-Thurnherr T, Xiao L, Diener L, Arslan O, Hirsch C, Maeder-Althaus X, et al. *In vitro* mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*. 2013;7(4):402–416. DOI: 10.3109/17435390.2012.666575.
68. Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*. 2009;185(3):211–218. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.01.008.
69. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, et al. An *in vitro* assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrology*. 2013;14:96. DOI: 10.1186/1471-2369-14-96.
70. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, et al. Zinc oxide nanoparticles induce photocatalytic cell death in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines *in vitro*. *International Journal of Oncology*. 2010;37(6):1583–1590. DOI: 10.3892/ijo.00000812.
71. Moratin H, Scherzad A, Gehrke T, Ickrath P, Radeloff K, Kleinsasser N, et al. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2018;59(3):247–259. DOI: 10.1002/em.22156.
72. Demir E, Akça H, Kaya B, Burgucu D, Tokgün O, Turna F, et al. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *Journal of Hazardous Materials*. 2014;264:420–429. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.043.
73. Shen C, Turney TW, Piva TJ, Feltis BN, Wright PFA. Comparison of UVA-induced ROS and sunscreen nanoparticle-generated ROS in human immune cells. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2014;13(5):781–788. DOI: 10.1039/c3pp50428j.

Получена 28.04.2024 / исправлена 27.05.2024 / принята 27.05.2024.
Received 28.04.2024 / revised 27.05.2024 / accepted 27.05.2024.

СИНТЕЗ БИОВОДОРОДА КЛЕТКАМИ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И СПОСОБЫ ЕГО СТИМУЛЯЦИИ

М. А. МЫСЛЕЙКО¹⁾, М. С. ВЕЧЕРЕК¹⁾, Дж. Г. МАНОЯН²⁾,
Л. С. ГАБРИЕЛЯН²⁾, Т. В. САМОВИЧ³⁾, Н. В. КОЗЕЛ^{4), 5)},
А. О. МУРАВИЦКАЯ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения

³⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича
НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

⁴⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

⁵⁾Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей»,
222202, д. Сосновая, Озеричко-Слободской с/с,
Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

Аннотация. Использование микроводорослей для производства биоводорода является одним из перспективных направлений современной биотехнологии и прикладной альгологии. В клетках зеленых микроводорослей процесс синтеза биоводорода осуществляется в электрон-транспортной цепи хлоропластов с помощью фермента [FeFe]-гидрогеназы и служит физиологической адаптацией к анаэробным условиям. Детальное понимание механизма синтеза биоводорода позволяет эффективнее использовать микроводоросли в качестве источника экологически чистого топлива. В представленном аналитическом обзоре рассматриваются механизмы биопродукции H₂ и его потенциальные роли в физиологии, а также подходы к стимуляции производства H₂ для биотехнологических целей.

Ключевые слова: водоросли; биоводород; гидрогеназа; депривация элементов; фотобиореактор.

Образец цитирования:

Мыслейко МА, Вечерек МС, Маноян ДжГ, Габриелян ЛС, Самович ТВ, Козел НВ, Муравицкая АО, Демидчик ВВ. Синтез биоводорода клетками зеленых микроводорослей и способы его стимуляции. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:36–45.
EDN: NCZWSI

For citation:

Mysleiko MA, Vecherek MS, Manoyan JG, Gabrielyan LS, Samovich TV, Kozel NV, Muravitskaya AO, Demidchik VV. Synthesis of biohydrogen by green microalgae and methods of increasing its production. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:36–45. Russian.
EDN: NCZWSI

Авторы:

Маргарита Алексеевна Мыслейко – студентка биологического факультета. Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Б. В. Адамович.

Максим Сергеевич Вечерек – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Джемма Гургеновна Маноян – аспирантка кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета. Научный руководитель – Л. С. Габриелян.

Лилия Сергеевна Габриелян – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета.

Татьяна Викторовна Самович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития растений.

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки⁴⁾, главный технолог⁵⁾.

Анна Олеговна Муравицкая – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, декан биологического факультета.

Authors:

Margarita A. Mysleiko, student at the faculty of biology.

Maksim S. Vecherek, student at the faculty of biology.

Jemma G. Manoyan, postgraduate student at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology.

jmanoyan@ysu.am

Lilit S. Gabrielyan, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology.

lgabrielyan@ysu.am

Tatyana V. Samovich, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of plant growth and development.

samovich77@gmail.com

Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; head of the laboratory of plant cell biophysics and biochemistry^d and chief technologist^e.

kozelmikalai@gmail.com

Anna O. Muravitskaya, postgraduate student at the department of cell biology and plant bioengineering, faculty of biology.

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor, dean of the faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

SYNTHESIS OF BIOHYDROGEN BY GREEN MICROALGAE AND METHODS OF INCREASING IT PRODUCTION

M. A. MYSLEIKO^a, M. S. VECHEREK^a, J. G. MANOYAN^b,
L. S. GABRIELYAN^b, T. V. SAMOVICH^c, N. V. KOZEL^{d,e},
A. O. MURAVITSKAYA^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bYerevan State University, 1 Aleka Manukjiana Street, Yerevan 0025, Armenia

^cInstitute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich,
National Academy of Sciences of Belarus,

27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^dInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^ePeasant (farm) economy «Serebryanyj ruchej», Sasnovaja 222202,
Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchyk@bsu.by)

Abstract. The use of microalgae for the production of biohydrogen is one of the promising areas of modern biotechnology and applied algology. In green microalgae cells, the process of biohydrogen synthesis is carried out in the electron transport chain of chloroplasts by the enzyme [FeFe]-hydrogenase and serves as a physiological adaptation to anaerobic conditions. A detailed understanding of the mechanism of biohydrogen synthesis makes it possible to more efficiently use microalgae as a source of environmentally clean fuel. This analytical review examines the mechanisms of H₂ bioproduction and its potential roles in physiology, as well as approaches to stimulating H₂ production for biotechnological purposes.

Keywords: algae; biohydrogen; hydrogenase; nutrient deprivation; photobioreactor.

Введение

На сегодняшний день большой интерес представляет культивирование автотрофных микроорганизмов, таких как зеленые микроводоросли, в целях производства биомассы [1–4]. Используя в качестве источника энергии солнечный свет, они способны наращивать большие объемы органической материи и синтезировать целевые соединения, что делает их привлекательным объектом для биотехнологии. Особенно перспективным представляется использование микроводорослей как источника топливных ресурсов, таких как водородное топливо (молекулярный водород (H₂) и производимый биологическими системами биоводород) [5].

Способность микроводорослей синтезировать H₂ известна с начала 1940-х гг. [6]. Однако только с недавнего времени данный феномен рассматривается в качестве источника получения биоводорода в промышленных масштабах [7; 8]. Ввиду этого в последние десятилетия усилились исследования метаболизма микроводорослей, связанного с продукцией H₂, а также интенсифицировались разработки в области промышленного получения биоводорода с помощью культур эукариотических микроводорослей [9–12].

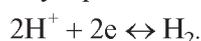
Целью настоящей работы являлся критический обзор и анализ современных исследований синтеза H₂ зелеными микроводорослями и его физиологической роли в клетке, а также исследований, направленных на разработку эффективных подходов к стимуляции генерации биоводорода физико-химическими методами.

Биосинтез H₂ зелеными микроводорослями: механизм и роль в физиологии клетки

Биосинтез H₂ встречается у ряда бактерий и микроводорослей, принадлежащих к различным таксономическим группам [13–15]. Он осуществляется с помощью разных биохимических механизмов и является следствием различных физиологических адаптаций [9; 16]. Согласно работе [16] в природе существует несколько путей биосинтеза H₂ на свету: 1) кислородный фотосинтез в сочетании с производством H₂, которое катализируется [FeFe]-гидрогеназой (характерно для зеленых микроводорослей) [6]; 2) кислородный фотосинтез в сочетании с производством H₂, катализируемым нитрогеназой (свойственно цианобактериям) [13]; 3) неокислительный фотосинтез в сочетании с производством H₂, которое также катализируется нитрогеназой (известно для пурпурных бактерий) [15].

Образование H_2 имеет большое значение для клетки, так как оно играет роль альтернативного пути метаболизма в анаэробных условиях [10; 16; 17]. Производство водорода клетками зеленых микроводорослей на свету неразрывно связано с реакциями фотосинтеза и выступает одним из анаэробных механизмов регуляции транспорта электронов и сопряженных с ним процессов [16]. Выделение H_2 позволяет поддерживать поток электронов, необходимый для генерации АТФ [16].

Продукция H_2 зелеными микроводорослями впервые была описана более 80 лет назад [6]. При этом продемонстрировано, что в анаэробных условиях зеленые микроводоросли способны выделять H_2 как в темноте, так и на свету [6]. В дальнейшем показано, что для синтеза водорода в хлоропластах необходимо наличие специальных ферментов, которые будут осуществлять формирование H_2 [11; 18–20]. Такую функцию выполняют ферменты семейства гидрогеназ [11; 18; 19]. Данные ферменты играют важную роль в защите клетки от избытка электронов, образующихся в условиях анаэробного стресса на свету, тем самым предотвращая повреждение фотосинтетического аппарата [19]. Гидрогеназы являются ферментативными комплексами, состоящими из одной или нескольких субъединиц. Они катализируют обратимое восстановление протонов до молекулярного водорода следующим образом [19]:

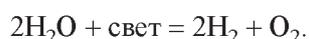


Особый интерес представляют возникновение и специализация гидрогеназ у зеленых микроводорослей, а также установление их тесного взаимодействия с фотосинтетическим аппаратом [11]. В качестве основной версии происхождения водородослевой гидрогеназы рассматривается горизонтальный перенос генов от представителей нефотосинтетических бактерий к предку современных водорослей [20]. В ходе эволюции у водорослей сформировался механизм локализации гидрогеназ в хлоропласте, где происходят их синтез и посттрансляционная модификация [18].

[FeFe]-гидрогеназы характеризуются наличием H-кластера в каталитическом центре [11]. Механизм образования молекулярного водорода с помощью [FeFe]-гидрогеназы реализуется следующим образом: посредством ферредоксина электроны доставляются к месту стыковки рядом с [4Fe4S]-кластером, откуда они переносятся в H-кластер, восстанавливая дистальный атом железа(II) [11]. Восстановленный атом Fe(II) стабилизируется благодаря присутствию лигандов CO и CN. Протонный путь от поверхности белка к каталитическому участку изучен не до конца. Вероятно, он включает остаток цистеина, расположенный рядом с H-кластером и действующий как конечный сайт связывания для одного из протонов. Второй протон, по-видимому, связывается с Fe(II). Конечная реакция включает процесс, в ходе которого образующийся гидрид-анион рекомбинирует со связанным протоном и выделяется в виде газа H_2 [11; 16].

Активный центр фермента, куда переносятся электроны от ферредоксина, чувствителен к кислороду, что лимитирует естественное производство H_2 в кислородных условиях [16]. Активность гидрогеназы ингибируется за счет подавления экспрессии генов *hyd*, окислительного повреждения каталитического центра и нарушения процесса созревания фермента [11; 21]. На свету анаэробные условия наступают, когда скорость фотосинтетического выделения O_2 становится ниже скорости митохондриального дыхания [22].

При нормальных аэробных условиях в хлоропластах зеленых микроводорослей осуществляется обычный процесс фотосинтеза, свойственный всем автотрофным организмам. Энергия света улавливается светособирающими белками реакционного центра фотосистемы-2 (ФС-2) и используется для расщепления воды на молекулы кислорода, протоны и электроны [17]. Эти фотосинтетические электроны посредством серии окислительно-восстановительных реакций продвигаются по электрон-транспортной цепи через комплекс цитохрома b_6f и фотосистему-1 (ФС-1) к железосерному белку ферредоксину, который затем переносит свои электроны на НАДФ⁺, восстанавливая его до НАДФН. В свою очередь, НАДФН является необходимым компонентом для функционирования цикла Кальвина, где происходят фиксация CO_2 и биосинтез важнейших для клетки веществ [16]. В анаэробных условиях ферредоксин вместо этого отдает свои электроны [FeFe]-гидрогеназе [11]. Такой путь известен как прямой биофотолит и свойствен исключительно зеленым микроводорослям (рис. 1). Водород образуется в результате расщепления воды ФС-2 в анаэробных условиях. В отсутствие кислорода световая энергия, собранная ФС-1 и ФС-2, линейно переносит электроны от воды к ферредоксину:



Производство H_2 эукариотическими зелеными микроводорослями путем прямого биофотолита требует от нескольких минут до нескольких часов анаэробной инкубации в темноте [23]. При переносе культуры из темновых анаэробных условий на свет выход водорода возрастает на несколько порядков [17]. Однако активное выделение H_2 носит временный характер, полностью затухая в течение нескольких минут. Именно этот феномен стал первым доказательством фотообразования водорода у зеленых микроводорослей [6]. Скачкообразный выброс водорода в указанных условиях является следствием быстрой индукции фотосинтетического транспорта электронов и восстановления ферредоксина и НАДФ⁺ в хлоропласте, пока ферменты цикла Кальвина находятся в инактивированном состоянии после инкубации

в темноте [24]. Причиной затухания процесса выступает, во-первых, дезактивация гидрогеназы в присутствии кислорода [21], а во-вторых, активация ферментов темновой фазы. Биосинтез H_2 конкурирует за электроны с другими восстановительными путями, прежде всего с ассимиляцией CO_2 . В исследованиях было продемонстрировано, что кратковременная выработка H_2 у вида *Chlamydomonas reinhardtii* наиболее высока при низкой концентрации CO_2 и наоборот [25]. Длительная выработка H_2 в отсутствие фиксации CO_2 предполагает центральную роль [FeFe]-гидрогеназы в поддержании фотосинтеза водорослей и приспособлении клеток к бескислородным условиям, а также защищает фотосинтетический аппарат от повреждений [17]. В случае инактивации цикла Кальвина потребление АТФ и НАДФН снижается, что обуславливает увеличение циклического транспорта через ФС-1, тем самым способствуя сильному подкислению люмена тилакоида. В свою очередь, подкисление люмена запускает механизмы фотозащитного тушения для рассеивания избыточной энергии, а также замедляет окисление пластохинона (PQ) комплексом цитохрома b_6f , следствием чего являются восстановление пула PQ и уменьшение переноса электронов из ФС-2 [22]. Все это в конечном итоге приводит к фотоповреждению фотосистем [17; 22]. Гидрогеназа может выступать в качестве конечного акцептора электронов в случае дезактивации цикла Кальвина [11]. Мутантный рибулозобисфосфаткарбоксилазодефицитный штамм *C. reinhardtii* продемонстрировал способность производить значительные количества H_2 в серосодержащей среде. В таком случае гидрогеназа, по-видимому, заменяет цикл Кальвина в качестве конечного акцептора электронов. В этом мутантном штамме, который почти не накапливает крахмал, электроны для выделения H_2 поступают преимущественно за счет расщепления воды в ФС-2 [10].

Установлено, что основным механизмом продукции H_2 является прямой биофотолит, или ФС-2-зависимый путь, при котором источником электронов служит фотолиз воды [9; 16]. Однако ФС-2, по-видимому, не играет ключевую роль в выделении H_2 , а ее участие в процессе факультативно. В то же время ФС-1 участвует также в ФС-2-независимом пути образования водорода [10]. Этот путь называется непрямым биофотолитом, или анаэробной темновой ферментацией (см. рис. 1). В данном случае источником электронов является органический субстрат, подвергнутый окислительному расщеплению. В качестве переносчика электрона выступает молекула НАД(Ф)Н, которая посредством НАД(Ф)Н-пластохинонооксидоредуктазы передает электрон на пул PQ, откуда он продвигается далее по электрон-транспортной цепи через цитохром b_6f , пластоцианин, ФС-1 и ферредоксин, в конечном итоге попадая на гидрогеназу [26].

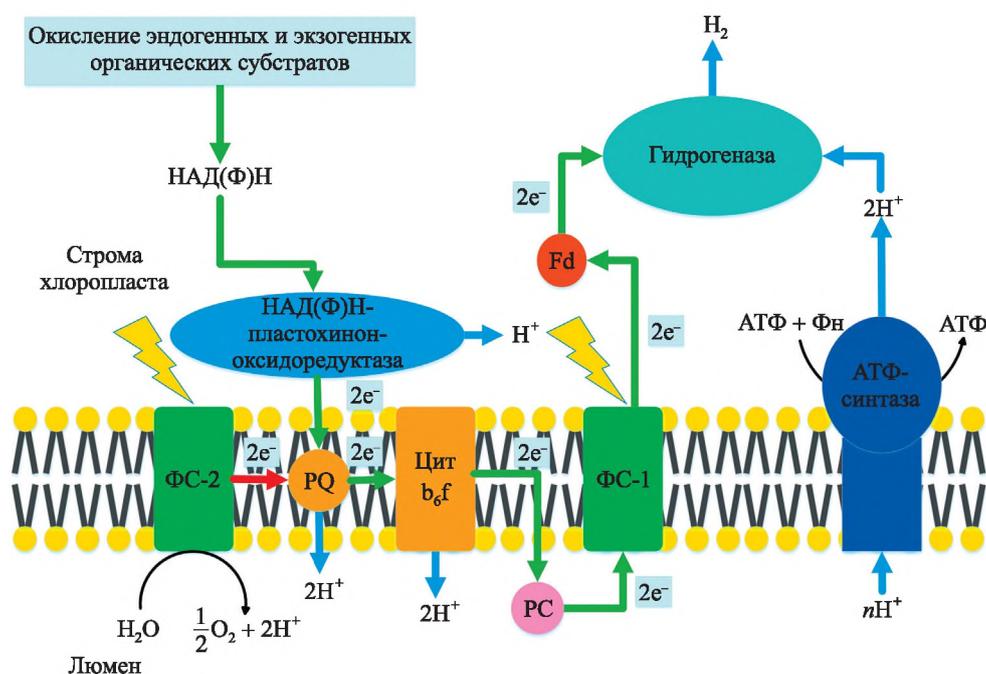


Рис. 1. Механизм синтеза H_2 в электрон-транспортной цепи на мембране тилакоида (Цит b_6f – цитохром b_6f ; PC – пластоцианин; Fd – ферредоксин; Фн – фосфат). Красная стрелка указывает путь переноса восстановительных эквивалентов при прямом биофотолит, зеленая стрелка – при прямом и непрямым биофотолит

Fig. 1. Mechanism of synthesis of H_2 in the electron transport chain in the thylakoid membrane (Цит b_6f – cytochrome b_6f ; PC – plastocyanin; Fd – ferredoxin; Фн – phosphate). The red arrow indicates the pathway of transfer of reducing equivalents during direct biophotolysis, green arrow – during direct and indirect biophotolysis

В темноте при ферментативном окислении эндогенного крахмала образуются такие продукты, как формиат, ацетат и этанол в соотношении 2,07 : 1,07 : 0,91 [27]. Помимо эндогенного крахмала, в качестве источника электронов могут выступать экзогенные углеродсодержащие соединения, в частности ацетат [28]. Ацетат имеет большое значение как субстрат для дыхания [29], а также возможный дополнительный источник электронов для образования H_2 при дефиците серы [8]. Метаболизм ацетата играет важную роль в процессе синтеза H_2 в клетке. Утилизация ацетата зависит от освещения и требует затрат АТФ. Существует два основных пути, которые могли бы объяснить образование CO_2 и H_2 из ацетата: 1) цикл лимонной кислоты; 2) цикл глиоксилата, связанный с превращением сукцината в углевод [28].

Согласно литературным данным выделение H_2 за счет эндогенного субстрата полностью блокировалось ингибитором дыхания фторуксусной кислотой, но эффекта со стороны 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (далее – 3,4-ДДМ) [30], являющейся ингибитором ФС-2, не наблюдалось [28]. Полученные результаты указывают на то, что в этих условиях реакция полностью зависит от окислительного метаболизма углерода в отличие от фотохимического пути выделения H_2 , когда 3,4-ДДМ оказывает ингибирующее действие на продукцию водорода [10; 12]. В случае использования экзогенного ацетата добавление 3,4-ДДМ снижает его поглощение. Анаэробное превращение ацетата в CO_2 и H_2 по чистому эффекту эквивалентно окислению в циклах лимонной кислоты и глиоксилата, отличие состоит в том, что образуется H_2 , а не H_2O . Электроны переносятся на пул PQ благодаря восстановленным пиридиновым нуклеотидам [26]. У водорослей ферменты циклов лимонной кислоты и глиоксилата расположены в митохондриях и цитоплазме соответственно. На основе непроницаемости оболочки хлоропласта для пиридиновых нуклеотидов было высказано предположение о том, что между митохондриями, цитоплазмой и хлоропластом функционирует переносчик дикарбоновой кислоты, обеспечивающий утилизацию восстановительной энергии, вырабатываемой дегидрогеназами, с конечным образованием H_2 [28].

Способы стимуляции продукции H_2 клетками зеленых микроводорослей

Наиболее изученным способом поддержания устойчивого образования H_2 является дефицит основных элементов минерального питания – серы (S), азота (N) и фосфора (P).

Сера поступает в клетку главным образом в виде сульфат-анионов (SO_4^{2-}) [31]. При нормальных условиях роста скорость фотосинтеза в 4–7 раз больше скорости дыхания, в то время как при S-депривации скорость дыхания превышает скорость фотосинтетического выделения O_2 , благодаря чему создаются анаэробные условия, подходящие для производства водорода [32]. Сера – незаменимый компонент аминокислот цистеина и метионина, при отсутствии которых биосинтез белка замедляется, и клетка не может синтезировать белок D1 ФС-2, в результате чего процесс восстановления ФС-2 от часто возникающих фотоокислительных повреждений блокируется [32]. Впервые на примере *C. reinhardtii* было обнаружено, что культивирование в условиях дефицита серы в течение 120 ч приводит к прогрессирующему снижению фотосинтетической способности в результате инактивации ФС-2 и повышения выделения O_2 до 95 %. Снижение активности переноса электронов обусловлено преобразованием центров ФС-2 из Q_B -восстанавливающей в Q_B -невосстанавливающую форму [32]. Абсолютная скорость фотосинтеза падает ниже скорости дыхания примерно через 24–30 ч культивирования при S-депривации [12; 33]. Как показали наши предварительные результаты, за этим переходом следует снижение окислительно-восстановительного потенциала среды от +400 мВ до примерно –300 мВ, что указывает на наступление анаэробноза (рис. 2).

Образование H_2 , наблюдаемое у клеток зеленых микроводорослей в условиях низкокислородного фотосинтеза и невысокой активности окислительного фосфорилирования, позволяет клетке выжить при стрессе, вызванном S-депривацией [9; 10]. Выделение H_2 – единственный доступный водорослям механизм, обеспечивающий выработку достаточного количества АТФ, необходимого для выживания организма в анаэробных условиях при дефиците серы [32]. Процесс предполагает последовательный переход через пять физиологических фаз: выделение O_2 , потребление O_2 , анаэробную стадию, фотопроизводство H_2 и терминацию [33].

При S-депривации в первые часы культивирования для образования H_2 необходима активная ФС-2 [9; 10]. То, что ФС-2 является основным источником электронов, демонстрирует добавление в культуру 3,4-ДДМ, которая связывается с Q_B -карманом ФС-2 и блокирует перенос электронов из ФС-2 в пул PQ [32]. При этом фотообразование водорода практически полностью прекращается [12; 14]. Однако в том случае, когда ингибитор ФС-2 вносился спустя некоторое время культивирования при дефиците серы, наблюдалось менее значительное снижение продукции H_2 [10]. В первые часы S-депривации в клетке происходит интенсивное накопление крахмала [16], который при переходе к фазе выделения водорода начинает деградировать, предоставляя электроны, поступающие в пул PQ, а далее на гидрогеназу [27].

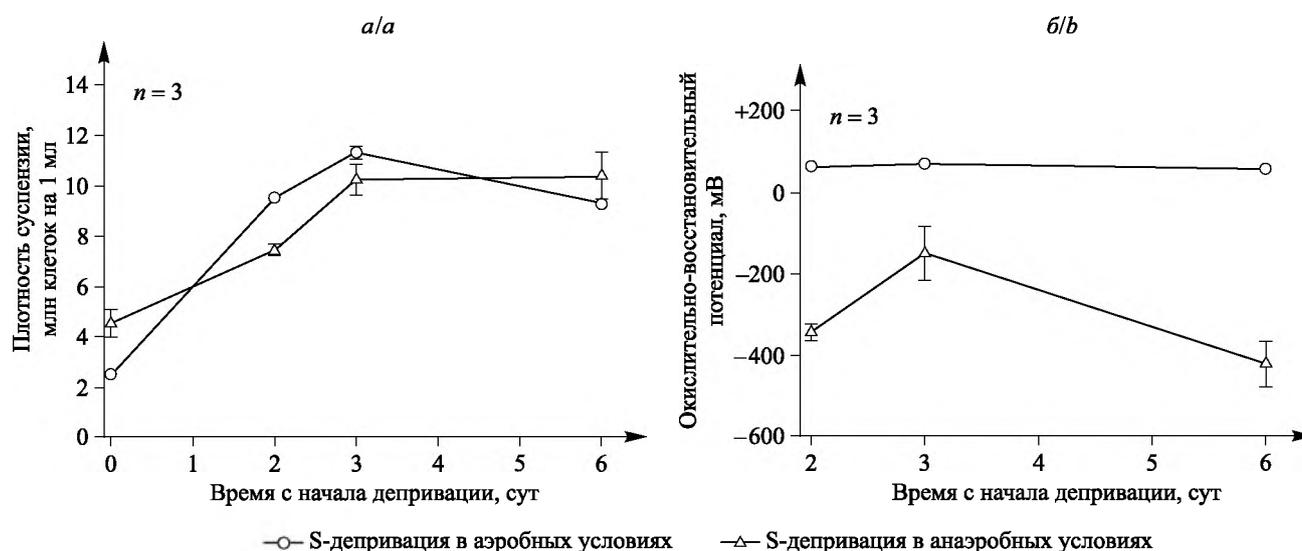


Рис. 2. Изменение плотности суспензии (а) и окислительно-восстановительного потенциала (б) суспензионной культуры *Parachlorella kessleri* RA-002 при S-депривации в аэробных и анаэробных условиях
Fig. 2. Changes of suspension density (a) and redox potential (b) of *Parachlorella kessleri* RA-002 under S-deprivation under aerobic and anaerobic conditions

Таким образом, вероятно, функционируют два пути образования H_2 в условиях S-депривации – ФС-2-зависимый и ФС-2-независимый пути [9; 12; 34]. Показано, что на долю фотоокисления воды в ФС-2 приходится до 80 % электронов, поступающих через электрон-транспортную цепь на гидрогеназу, оставшиеся 20 % электронов поступают в результате частичного окисления запасных продуктов, которые используются для восстановления пула PQ и впоследствии переносятся на ФС-1 при освещении [35]. Образование продуктов ферментативного метаболизма, таких как формиат, ацетат и этанол, возрастает после добавления в культуру 3,4-ДДМ [30], что свидетельствует о переходе процесса производства H_2 на ФС-2-независимый путь [36].

Основным условием при использовании S-депривации для стимуляции синтеза H_2 является поддержание стабильной продукции H_2 на протяжении длительного времени. Однако в условиях S-депривации стабильная выработка биоводорода сохраняется только в течение нескольких дней, после чего фотосинтетические процессы безвозвратно угнетаются [34]. В связи с этим для поддержания длительной продукции H_2 необходимо периодически переводить культуру на полноценную среду для возобновления фотосинтетической функции [9].

Недостаток азота – серьезное стрессовое состояние для всех организмов, поскольку азот является основным компонентом белков и нуклеиновых кислот. В клетках растений этот элемент действует как строительный блок для хлорофиллов, и его дефицит приводит к снижению синтеза хлорофиллов и уменьшению количества единиц фотосинтетического аппарата [37]. Недостаток азота также является причиной деградации рибулозобисфосфаткарбоксилазы (далее – рубиско) и снижения фотохимической эффективности ФС-2 [38]. Более низкие количества ферредоксина при N-депривации [38] могут быть препятствием для переноса электронов к гидрогеназе, приводя к уменьшению выхода H_2 в таких условиях. Культуры, лишенные азота, демонстрируют устойчивую, но при этом низкую активность гидрогеназы и производят незначительные количества H_2 [37]. По этим причинам для подавления работы кислородвыделяющего комплекса и стимуляции продукции H_2 клетками зеленых микроводорослей используется не полная N-депривация, а частичное лимитирование обеспеченности данным элементом [37; 38].

Предположительный механизм стимуляции продукции H_2 при ограничении азота и совместной депривации серы и азота реализуется из-за блокирования переноса электронов и повреждения кислородвыделяющего комплекса [38]. Большая эффективность выделения H_2 при совместной депривации серы и азота показывает значительный вклад серы в процесс ингибирования кислородвыделяющего комплекса и продукции H_2 [38]. Внесение в культуру 3,4-ДДМ демонстрирует роль серы в функционировании ФС-2-независимого пути [38].

Влияние лимитирования азота, а также одновременной депривации серы и азота на синтез H_2 недавно было изучено на примере зеленой микроводоросли *Chlorella protothecoides* [37]. В случае одновременной депривации серы и азота продукция H_2 значительно повышалась по сравнению с контролем

и отдельными депривациями серы или азота. Для N-лимитирования были выбраны три концентрации аммония (1,75; 0,70 и 0,35 ммоль · л⁻¹). Начальная концентрация аммония для достижения максимального выхода H₂ составила 0,35 ммоль · л⁻¹ NH₄Cl в культуре [37]. Максимальный выход и средняя скорость образования H₂ при этом были равны 233,7 мл · л⁻¹ и 2,19 мл · л⁻¹ · ч⁻¹ соответственно [37].

В ходе исследования влияния ограничения азота на производство H₂ у *C. reinhardtii* была отмечена меньшая эффективность N-лимитирования, чем S-депривации [38]. N-лимитированная культура демонстрировала задержку в начале установления анаэробноз и фазы образования H₂ по сравнению с S-дефицитной культурой (72 и 32 ч соответственно). Задержка также наблюдалась в достижении максимальной ферментативной активности гидрогеназы (192 и 120 ч). Обе дефицитные культуры постепенно поглощали O₂ до наступления гипоксии. Однако клетки с N-лимитированием демонстрировали задержку в потреблении O₂ и обнаруживали временное накопление кислорода [38]. Эта задержка сопровождалась более медленным снижением скорости эволюции фотосинтетического O₂ и более высокой долей неповрежденных активных центров ФС-2 [38]. Было высказано предположение о том, что в условиях N-лимитирования пул PQ в клетках может быть менее восстановлен, чем при S-депривации, обеспечивая большую скорость передачи электронов от Q_A к Q_B и повторное окисление Q_B [39]. Причина более окисленного пула PQ в N-лимитированных клетках по сравнению с пулом PQ в S-дефицитных клетках может заключаться в повышенной активности фотодыхания при N-депривации. Другой причиной различий в фотохимической активности ФС-2 может быть разница в содержании пигментов, наблюдаемая в клетках *C. reinhardtii* при S- или N-депривации. Клетки с N-лимитированием показали более низкое содержание хлорофилла и более высокое соотношение каротиноидов и хлорофилла, а также хлорофилла *a* и хлорофилла *b*. Различия в составе пигментов и антенн, вероятно, влияли на передачу световой энергии в фотосистеме, что приводило к меньшему возбуждению и большей открытости реакционного центра ФС-2 [38].

В работе Л. С. Габриелян и соавторов исследовалась способность штамма *P. kessleri* RA-002, выделенного в Армении, к продукции биоводорода на средах TAP и Тамия при N-лимитировании и без него. Удаление азота привело к снижению скорости роста и уменьшению содержания фотосинтетических пигментов, одновременно повысив выход H₂. Максимальный выход H₂ при дефиците азота составил 5,25 ммоль · л⁻¹ (среда TAP) и 3,65 ммоль · л⁻¹ (среда Тамия), что в 4–5 раз больше, чем в случае нормальной обеспеченности данным элементом [40]. В другой работе того же коллектива авторов изучались уровень фотосинтетических пигментов, фотосинтетическая активность и генерация биоводорода у *C. vulgaris* IBCE C-19 и *P. kessleri* MDC6524 в ответ на дефицит серы и азота [41]. Полученные результаты показали, что недостаток этих элементов вызывал замедление роста в обеих культурах, что сопровождалось снижением уровня фотосинтетических пигментов, активности ФС-2 и синтеза полифенолов. Скорость генерации H₂ микроводорослями *C. vulgaris* и *P. kessleri* в контроле составила 0,40 и 0,34 мл · ч⁻¹ соответственно. Наибольший выход H₂ был показан при совместном дефиците серы и азота (60 мл · л⁻¹ для *C. vulgaris* (скорость генерации H₂ ~1,25 мл · ч⁻¹) и 68 мл · л⁻¹ для *P. kessleri* (скорость генерации H₂ ~1,42 мл · ч⁻¹), что в 3–4 раза превышает выход H₂ в контроле). Также была отмечена тенденция к большей стимуляции синтеза H₂ при N-лимитировании, чем при S-депривации [41].

Дефицит фосфора оказывает сходное с дефицитом серы влияние на активность ФС-2 и функционирование альтернативных путей электронного транспорта с конечным образованием H₂ [32; 42; 43]. Влияние P-депривации на работу фотосинтетического аппарата было исследовано на примере *C. reinhardtii* [32; 43]. Однако эффект P-депривации был выражен слабее по сравнению с эффектом S-депривации. Потребовалось более длительное время для установления анаэробного режима и начала стадии выделения H₂ (100 ч при P-депривации и 18–40 ч при S-депривации) [43]. Этот факт можно объяснить гораздо большими внутриклеточными запасами фосфора, чем серы [32]. Поскольку прямое исключение фосфора из среды не приводит к немедленному эффекту фосфорного голодания, был применен метод разведения [43]. При этом культуры, промытые от фосфора и разбавленные до уровня хлорофилла менее 2 мг · л⁻¹ в среде, не содержащей фосфатов, входили в анаэробноз в фотобиореакторе после периода роста и производили H₂ в количествах, близких к таковым у культур с дефицитом серы. Максимальный полученный объем H₂ составил 68 мл · л⁻¹ [43].

Одним из способов снижения эксплуатационных затрат при производстве H₂ является осуществление процесса его синтеза в морской воде [42]. При данном подходе недостаток фосфора может стать эффективным методом повышения скорости фотопроизводства H₂, так как недостаток серы невозможен из-за высокой концентрации сульфатов в морской воде [42].

Хотя депривация элементов минерального питания является наиболее простым и эффективным способом стимуляции клеток зеленых микроводорослей к выделению H₂, данный подход имеет недостатки, препятствующие его промышленному применению [44]. Процедура требует нескольких промывок,

производство H_2 начинается с задержкой примерно на 2 сут [36], зависит от ацетата [30] и в конечном итоге приводит к инактивации ФС-2 и деградации фотосинтетического аппарата [12; 34]. Продувка культуры инертным газом для удаления O_2 , центрифугирование с последующей сменой среды обуславливают вымывание и потерю плотности культуры. Для того чтобы избежать негативного эффекта от данных манипуляций и сделать процесс более быстрым и удобным, можно использовать метод иммобилизованных клеток. Для такой иммобилизации применяются классические гели, такие как альгинат и агар [45].

Имеются литературные данные о возможности использования химически индуцированной селекции для получения штаммов-продуцентов H_2 , характеризующихся низкой чувствительностью гидрогеназы к O_2 [21]. Данная селекция основана на токсическом воздействии метронидазола (окислителя ферредоксина) на работу фотосинтетического аппарата. Поскольку токсичность метронидазола зависит от накопления восстановленного ферредоксина, организм с активной гидрогеназой приобретает меньшую чувствительность к метронидазолу. Выжившие в присутствии метронидазола клетки демонстрировали высокую гидрогеназную активность при значительной концентрации O_2 (до 8 % парциального давления) [21].

Методы стимуляции продукции биоводорода клетками зеленых микроводорослей, предложенные в последние 20–30 лет, представлены в таблице.

Методы стимуляции продукции H_2 клетками зеленых микроводорослей
Methods of stimulation of H_2 production by green microalgae cells

| Метод | Механизм действия | Источник |
|--|--|--------------|
| S-депривация | При недостатке серы нарушается синтез белков, необходимых для репарации ФС-2, вследствие чего снижается выход O_2 и устанавливаются анаэробные условия, которые требуются для активации гидрогеназы и выделения H_2 | [9; 12; 34] |
| N-лимитирование | Дефицит азота приводит к подавлению синтеза хлорофиллов и уменьшению количества единиц фотосинтетического аппарата, а также к деградации рубиско и снижению фотохимической эффективности ФС-2 | [37–41] |
| P-депривация | Недостаток фосфора оказывает схожее с дефицитом серы влияние на активность ФС-2 и функционирование альтернативных путей электронного транспорта с конечным образованием H_2 | [32; 42; 43] |
| Селекция клеток с гидрогеназой, нечувствительной к O_2 | Данный тип селекции основывается на токсическом действии метронидазола, являющегося сильным окислителем ферредоксина, на работу фотосинтетического аппарата. Так как токсичность метронидазола зависит от накопления восстановленного ферредоксина, организм с активной гидрогеназой приобретает меньшую чувствительность к метронидазолу, поскольку становится более доступным альтернативный путь для переноса электронов с ферредоксина | [21] |

Заключение

Проанализированы механизмы образования H_2 в клетках зеленых микроводорослей и способы его стимуляции, а также приведена характеристика различных методов культивирования микроводорослей для эффективной продукции H_2 в целях использования его в качестве экологически чистого топлива. Анализ литературы показал, что на сегодняшний день наиболее эффективным и часто используемым методом стимуляции продукции биоводорода клетками зеленых микроводорослей является депривация макроэлементов минерального питания, таких как сера, азот и фосфор. В основе данного метода лежат инактивация работы ФС-2, приводящая к снижению выделения кислорода в ходе фотоллиза воды, и установление анаэробноза, являющегося ключевым условием образования H_2 . Однако метод депривации требует сложных манипуляций по смене среды, что препятствует его эффективному и масштабному применению. В настоящее время для преодоления ряда препятствий в развитии промышленного получения биоводорода зелеными микроводорослями ведется поиск других способов повышения эффективности этого процесса. Интерес для дальнейших исследований представляют метод селекции штаммов с гидрогеназой, нечувствительной к кислороду, совместное культивирование зеленых микроводорослей с бактериями, а также применение методов геной инженерии.

Библиографические ссылки / References

1. Niccolai A, Chini Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR. Microalgae of interest as food source: biochemical composition and digestibility. *Algal Research*. 2019;42:101617. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101617.
2. Milledge JJ. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2011;10(1):31–41. DOI: 10.1007/s11157-010-9214-7.
3. Borowitzka MA. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*. 1995;7(1):3–15. DOI: 10.1007/BF00003544.
4. Guccione A, Biondi N, Sampietro G, Rodolfi L, Bassi N, Tredici MR. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a green wall panel photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*. 2014;7(1):84. DOI: 10.1186/1754-6834-7-84.
5. Edwards PP, Kuznetsov VL, David WIF, Brandon NP. Hydrogen and fuel cells: towards a sustainable energy future. *Energy Policy*. 2008;36(12):4356–4362. DOI: 10.1016/j.enpol.2008.09.036.
6. Gaffron H, Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *Journal of General Physiology*. 1942;26(2):219–240. DOI: 10.1085/jgp.26.2.219.
7. Show K-Y, Lee D-J, Chang J-S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*. 2011;102(18):8524–8533. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.055.
8. Show K-Y, Yan Y, Zong C, Guo N, Chang J-S, Lee D-J. State of the art and challenges of biohydrogen from microalgae. *Bioresource Technology*. 2019;289:121747. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121747.
9. Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(12):506–511. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01511-0.
10. Hemschemeier A, Fouchard S, Cournac L, Peltier G, Happe T. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*. 2008;227(2):397–407. DOI: 10.1007/s00425-007-0626-8.
11. Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness P-C, Dubini A, Yu J, Seibert M. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2007;58:71–91. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103848.
12. Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2000;122(1):127–136. DOI: 10.1104/pp.122.1.127.
13. Benemann JR, Weare NM. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science*. 1974;184(4133):174–175. DOI: 10.1126/science.184.4133.174.
14. Khetkorn W, Rastogi RP, Incharoensakdi A, Lindblad P, Madamwar D, Pandey A, et al. Microalgal hydrogen production – a review. *Bioresource Technology*. 2017;243:1194–1206. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.085.
15. Basak N, Jana AK, Das D, Saikia D. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: the present progress and future perspective. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014;39(13):6853–6871. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.02.093.
16. Ghirardi ML, Dubini A, Yu J, Maness P-C. Photobiological hydrogen-producing systems. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(1):52–61. DOI: 10.1039/B718939G.
17. Kosourov S, Nagy V, Shevela D, Jokel M, Messinger J, Allahverdiyeva Y. Water oxidation by photosystem II is the primary source of electrons for sustained H₂ photoproduction in nutrient-replete green algae. *PNAS*. 2020;117(47):29629–29636. DOI: 10.1073/pnas.2009210117.
18. Sawyer A, Bai Y, Lu Y, Hemschemeier A, Happe T. Compartmentalisation of [FeFe]-hydrogenase maturation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*. 2017;90(6):1134–1143. DOI: 10.1111/tjp.13535.
19. Happe T, Mosler B, Naber JD. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*. 1994;222(3):769–774. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18923.x.
20. Meyer J. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64:1063–1084. DOI: 10.1007/s00018-007-6477-4.
21. Ghirardi ML, Togaasaki RK, Seibert M. Oxygen sensitivity of algal H₂-production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997;63:141–151. DOI: 10.1007/BF02920420.
22. Erickson E, Wakao S, Niyogi KK. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*. 2015;82(3):449–465. DOI: 10.1111/tjp.12825.
23. Greenbaum E. Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science*. 1982;215(4530):291–293. DOI: 10.1126/science.215.4530.291.
24. Cournac L, Mus F, Bernard L, Guedeney G, Vignais P, Peltier G. Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002;27(11–12):1229–1237. DOI: 10.1016/S0360-3199(02)00105-2.
25. Cinco RM, MacInnis JM, Greenbaum E. The role of carbon dioxide in light-activated hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research*. 1993;38(1):27–33. DOI: 10.1007/BF00015058.
26. Gfeller RP, Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Role of plastoquinone. *Plant Physiology*. 1985;77(2):509–511. DOI: 10.1104/pp.77.2.509.
27. Gfeller RP, Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiology*. 1984;75(1):212–218. DOI: 10.1104/pp.75.1.212.
28. Gibbs M, Gfeller RP, Chen C. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Photoassimilation of acetate. *Plant Physiology*. 1986;82(1):160–166. DOI: 10.1104/pp.82.1.160.
29. Goulding KH, Merrett MJ. The photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Experimental Botany*. 1966;17(4):678–689. DOI: 10.1093/jxb/17.4.678.
30. Bishop NI. The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1958;27:205–206. DOI: 10.1016/0006-3002(58)90313-5.
31. Tamburic B, Zemichael FW, Maitland GC, Hellgardt K. A novel nutrient control method to deprive green algae of sulphur and initiate spontaneous hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(11):8988–9001. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.02.043.

32. Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 1998;117(1):129–139. DOI: 10.1104/pp.117.1.129.
33. Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M, Ghirardi ML. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;78(7):731–740. DOI: 10.1002/bit.10254.
34. Zhang L, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*. 2002;214:552–561. DOI: 10.1007/s004250100660.
35. Kosourov S, Seibert M, Ghirardi ML. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant and Cell Physiology*. 2003;44(2):146–155. DOI: 10.1093/pcp/pcg020.
36. Scoma A, Durante L, Bertin L, Fava F. Acclimation to hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*: can biophotolysis be the major trigger for long-term H₂ production? *New Phytologist*. 2014;204(4):890–900. DOI: 10.1111/nph.12964.
37. He M, Li L, Zhang L, Liu J. The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(22):16903–16915. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.121.
38. Philipps G, Happe T, Hemschemeier A. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 2012;235(4):729–745. DOI: 10.1007/s00425-011-1537-2.
39. Peltier G, Schmidt GW. Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS*. 1991;88(11):4791–4795. DOI: 10.1073/pnas.88.11.4791.
40. Manoyan J, Samovich T, Kozel N, Demidchik V, Gabrielyan L. Growth characteristics, biohydrogen production and photochemical activity of photosystems in green microalgae *Parachlorella kessleri* exposed to nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2022;47(38):16815–16823. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2022.03.194.
41. Manoyan J, Hakobyan L, Samovich T, Kozel N, Sahakyan N, Muravitskaya H, et al. Comparison of sulfur and nitrogen deprivation effects on photosynthetic pigments, polyphenols, photosystems activity and H₂ generation in *Chlorella vulgaris* and *Parachlorella kessleri*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2024;59:408–418. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2024.02.035.
42. Batyrova K, Gavrisheva A, Ivanova E, Liu J, Tsygankov A. Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):2705–2716. DOI: 10.3390/ijms16022705.
43. Batyrova KA, Tsygankov AA, Kosourov SN. Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(10):8834–8839. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.068.
44. Nagy V, Podmaniczki A, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Kovács L, Rákhely G, et al. Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin – Benson – Bassham cycle. *Biotechnology for Biofuels*. 2018;11:69. DOI: 10.1186/s13068-018-1069-0.
45. Song W, Rashid N, Choi W, Lee K. Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresource Technology*. 2011;102(18):8676–8681. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.082.

Получена 18.05.2024 / исправлена 24.05.2024 / принята 25.05.2024.
Received 18.05.2024 / revised 24.05.2024 / accepted 25.05.2024.

УДК 577.331.34, 577.355, 577.3.321.36

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ФОРМ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК И ДЕГРАДАЦИЮ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЕРАТИНОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. В. КОСТЮК¹⁾, Т. Г. ШУТОВА²⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт химии новых материалов НАН Беларуси, ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования кумохинона для моделирования окислительного стресса и изучения его последствий в культивируемых кератиноцитах человека линии HaCaT. Показано, что гибель клеток, повреждение ДНК и появление атипичных ДНК-комет в кератиноцитах, подвергнутых воздействию кумохинона, связаны не с его генотоксичностью, а главным образом с развитием окислительного стресса. Установлено, что кверцетин оказывает цитопротекторное действие и уменьшает степень повреждения ядерной ДНК в условиях окислительного стресса, инициируемого кумохиноном. Этот эффект существенно возрастает при использовании микроструктурированных форм кверцетина, что может быть обусловлено увеличением его клеточной доступности.

Ключевые слова: кератиноциты HaCaT; п-бензохиноны; кверцетин; микроструктуры; окислительный стресс; повреждение ДНК; ДНК-кометы.

Образец цитирования:

Потапович АИ, Костюк ТВ, Шутова ТГ, Костюк ВА. Влияние кверцетина и его микроструктурированных форм на жизнеспособность клеток и деградацию ядерной ДНК в кератиноцитах человека при моделировании окислительного стресса. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:46–54. EDN: ORFOSU

For citation:

Potapovich AI, Kostyuk TV, Shutava TG, Kostyuk VA. Effect of quercetin and its microstructured forms on cell viability and nuclear DNA degradation in human keratinocytes when modeling oxidative stress. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:46–54. Russian. EDN: ORFOSU

Сведения об авторах см. на с. 54

Information about the authors see p. 54

EFFECT OF QUERCETIN AND ITS MICROSTRUCTURED FORMS ON CELL VIABILITY AND NUCLEAR DNA DEGRADATION IN HUMAN KERATINOCYTES WHEN MODELLING OXIDATIVE STRESS

A. I. POTAPOVICH^a, T. V. KOSTYUK^a, T. G. SHUTAVA^b, V. A. KOSTYUK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInstitute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus,
36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Abstract. Experimental data are presented indicating the possibility of using cumoquinone to model oxidative stress and study its consequences in cultured human keratinocytes of the HaCaT line. It has been shown that cell death, DNA damage and the appearance of atypical DNA comets in keratinocytes exposed to cumoquinone are associated not with its genotoxicity, but mainly with the development of oxidative stress. It has been established that quercetin has a cytoprotective effect and reduces the degree of damage to nuclear DNA under conditions of oxidative stress initiated by cumoquinone. This effect increases significantly when microstructured forms of quercetin are used, which may be due to an increase in its cellular availability.

Keywords: HaCaT keratinocytes; p-benzoquinones; quercetin; microstructures; oxidative stress; DNA damage; DNA comets.

Введение

Общеизвестно, что негативное влияние различных факторов внешней среды на аэробные организмы во многих случаях реализуется посредством активации продукции активных форм кислорода (АФК) и инициирования окислительного стресса. Структурно-функциональные нарушения и гибель клеток в результате окислительного стресса и чрезмерного образования АФК могут быть важным патогенетическим фактором возникновения и прогрессирования различных заболеваний. В связи с этим весьма актуальным является создание клеточных моделей, позволяющих изучать последствия воздействия окислительного стресса на структурно-функциональное состояние клеток, и их использование для поиска средств фармакологической коррекции возникающих нарушений. В качестве таких средств большой интерес представляют растительные полифенольные соединения, в частности флавоноиды, обладающие широким спектром биологической активности [1; 2]. Тем не менее клиническое применение флавоноидов ограничено в основном низкой растворимостью в воде, что обуславливает их слабое поглощение клетками и плохое проникновение через кожу. Для преодоления этих ограничений молекулы потенциальных лекарств могут быть включены в липосомы или полимерные нано- и микрочастицы, обладающие большим потенциалом для использования в качестве их переносчиков [3].

Среди органических соединений, способных инициировать развитие окислительного стресса в клетках и тканях, особый интерес представляют хиноны [4]. Окислительный стресс возникает, когда хинон восстанавливается цитоплазматическими редуктазами до радикала семихинона, который, в свою очередь, восстанавливает кислород до супероксидных радикалов, окисляясь обратно до хинона. Кроме того, большинство хинонов образуют конъюгаты с восстановленным глутатионом, которые также вовлекаются в циклические окислительно-восстановительные реакции и активацию кислорода [4]. Инициирование окислительного стресса в значительной степени обуславливает цитотоксическое действие хинонов. В частности, показано, что в анаэробных условиях, при которых снижается возможность образования АФК, существенно уменьшается цитотоксическое действие тимохинона и доксорубина [5]. Среди производных п-бензохинона высокой способностью индуцировать окислительный стресс обладают тетраметил-п-бензохинон (дурохинон) (рис. 1, а) и 2,3,5-триметил-п-бензохинон (кумохинон) (рис. 1, б) [6; 7]. В данной работе эти соединения были использованы для моделирования патогенетических процессов в кератиноцитах человека в целях оценки фармакологической эффективности нативного и микроструктурированного кверцетина в условиях окислительного стресса.

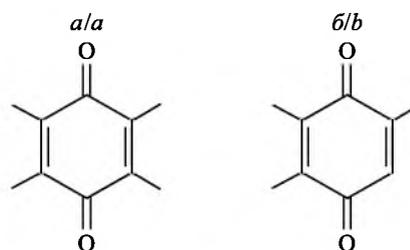


Рис. 1. Структура исследованных п-бензохинонов:
а – дурухинон; б – кумохинон

Fig. 1. Structure of the studied p-benzoquinones:
a – duroquinone; b – cumoquinone

Материалы и методы исследования

Реагенты. Модифицированная среда Игла (DMEM), этидиумбромид, кверцетин, додецилсульфат натрия, трипсин, полиэтиленимин, полистиролсульфонат натрия, полиаллиламингидрохлорид, декстран-сульфат были приобретены у компании *Sigma-Aldrich* (Германия), антибиотики – у фирмы *Gibco* (США), изотонический фосфатный буфер (ИФБ; pH 7,4) куплен у компании *Lonza* (Бельгия), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) приобретена у фирмы *Capricorn Scientific* (Польша). Коммерческий дурохинон, очищенный методом перекристаллизации, и кумохинон, полученный путем контролируемого окисления коммерческого 2,3,5-триметилгидрохинона [8], были любезно предоставлены профессором О. И. Шадыро (химический факультет БГУ). Микроструктура (PАН/PPS)₄ на основе полиаллиламингидрохлорида и полистиролсульфоната и микроструктура (Hit/DS)₄ на основе хитозана и декстрансульфата, имеющие средний размер (1,1 ± 0,3) мкм, формировались методом послойной сборки в водных растворах. Оба типа микроструктур, содержащих 10 мг/мл кверцетина, растворялись в 0,9 % NaCl.

Клеточные культуры. Иммуортилизованная клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT предоставлена доктором Н. Е. Фузенигом (Немецкий центр исследования рака (*Deutsches Krebsforschungszentrum*), Гейдельберг, Германия).

Общая схема проведения экспериментов. Клетки культивировали во флаконах T25 (*Sarstedt*, США) в среде DMEM, содержащей 10 % ЭБС, при стандартных условиях (37 °C; 5 % CO₂). Экспозицию с исследуемыми веществами проводили в 96- и 24-луночных планшетах. Для получения необходимой концентрации растворы препаратов добавляли к среде инкубации, не содержащей сыворотки.

Анализ жизнеспособности клеток. Изучение влияния производных п-бензохинона на жизнеспособность культивируемых клеток проводили в 96-луночных планшетах с помощью реагента PrestoBlue™ (*Introvigen*, США) согласно инструкции. Величину флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (*Varian*, Австралия) после инкубации при температуре 37 °C в течение 1,5–2,0 ч, используя фильтр с $\lambda_{\text{ex}} = (560 \pm 25)$ нм, $\lambda_{\text{em}} = (590 \pm 10)$ нм. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Оценка целостности клеток по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В этих экспериментах клетки растили в 24-луночных планшетах. Активность ЛДГ определяли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл ИФБ, содержащего 30 мкмоль/л пирувата и 30 мкмоль/л НАДН, по величине изменения оптической плотности при 340 нм за 1 мин. Процент высвобождения ЛДГ (процент повреждения клеток) рассчитывали путем деления активности ЛДГ в среде культивирования на суммарную активность ЛДГ в среде и лизатах адгезированных клеток.

Анализ повреждений ДНК с помощью метода ДНК-комет. Клетки, высеянные в 24-луночный планшет, культивировали в течение 2 ч после добавления кумохинона. Щелочной комет-анализ проводили по описанной в работах [9; 10] методике: клетки трипсинизировали, 50 мкл клеточной суспензии каждой экспериментальной серии добавляли к 300 мкл 0,7 % легкоплавкой агарозы и наносили полученную смесь на предметные стекла, предварительно покрытые агарозой с нормальной температурой плавления. Препараты помещали в лизирующий буфер и выдерживали в темноте при температуре 4 °C в течение 20 ч. Затем предметные стекла 20 мин инкубировали в щелочном буфере для электрофореза (0,3 моль/л NaOH и 1 ммоль/л ЭДТА; pH 13) и проводили электрофорез при силе тока 300 мА на протяжении 20 мин. Образцы дважды промывали в нейтрализующем растворе (pH 7,4; 4 °C), фиксировали последовательно в 70 % этаноле и 96 % этаноле в течение 5 мин, сушили на воздухе и окрашивали этидиумбромидом. Кометы наблюдали при 200-кратном увеличении с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert-25 (*Carl Zeiss*, Германия) и документировали с помощью цифровой камеры. Процент ДНК в хвосте (поврежденная ДНК) был рассчитан для каждой кометы с использованием инструмента «гистограммы» программы *Photoshop* (версия 7). Данные трех независимых экспериментов усредняли для каждого экспериментального условия ($n \approx 50$ клеток).

Определение содержания восстановленного глутатиона. Содержание восстановленного глутатиона определяли с помощью реакции с флуоресцентным реагентом ThioGlo-1 (*SABiosciences*, Италия) [11] в 96-луночных планшетах. При анализе образцов в лунки добавляли 200 мкл рабочего раствора ThioGlo-1. Планшет инкубировали на шейкере в темноте при комнатной температуре в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции в лунках, используя планшетный флуориметр ($\lambda_{\text{ex}} = 355$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 535$ нм). Содержание восстановленного глутатиона в пробах рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием его рабочего раствора. Тиоловые группы белков определяли как дополнительную реакцию флуоресценции после добавления додецилсульфата натрия (4 ммоль/л) к тем же образцам и их последующей инкубации на шейкере в темноте в течение 60 мин.

Статистический анализ. Полученные данные были сведены в таблицы и проанализированы программой *Excel*. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическая значимость (p) оценивалась с использованием двустороннего непарного критерия Стьюдента. Достоверными считались значения $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование цитотоксических эффектов п-бензохинонов в отношении кератиноцитов человека.

При анализе жизнеспособности клеток через 24 ч инкубации в среде ДМЕМ, содержащей производные п-бензохинона в диапазоне концентраций 50–200 мкмоль/л, установлено, что исследуемые соединения оказывают дозозависимое влияние на жизнеспособность кератиноцитов. При этом кумохинон обладает гораздо более выраженным цитотоксическим действием, вызывая полную гибель клеток в концентрации 200 мкмоль/л, тогда как при использовании дурохинона в этой же концентрации жизнеспособность клеток снижается только на $(33 \pm 17) \%$. В ходе исследований по изучению влияния продолжительности воздействия кумохинона (200 мкмоль/л) на жизнеспособность и целостность кератиноцитов установлено, что он оказывает незначительное, но достоверное цитотоксическое действие уже через 2 ч инкубации с клетками. При этом через 4 ч инкубации жизнеспособность кератиноцитов снизилась более чем на 90 %, а целостность клеточной мембраны была нарушена более чем у 30 % клеток (рис. 2, а).

Общеизвестно, что при развитии окислительного стресса происходит интенсивное расходование антиоксидантов, в первую очередь восстановленного глутатиона, а также окисление тиоловых групп белков. В связи с этим было исследовано влияние кумохинона на уровень данных маркеров окислительного стресса в кератиноцитах.

Как следует из данных, представленных на рис. 2, б, инкубация кератиноцитов с кумохиноном (200 мкмоль/л) в течение 1 ч приводит к существенному уменьшению содержания восстановленных тиолов, при этом уровень восстановленного глутатиона снижается на 57 %. Таким образом, уже через 1 ч после внесения кумохинона в культуральную среду клетки находятся в условиях окислительного стресса, который может рассматриваться как причина последующего снижения их жизнеспособности и нарушения целостности плазматической мембраны.

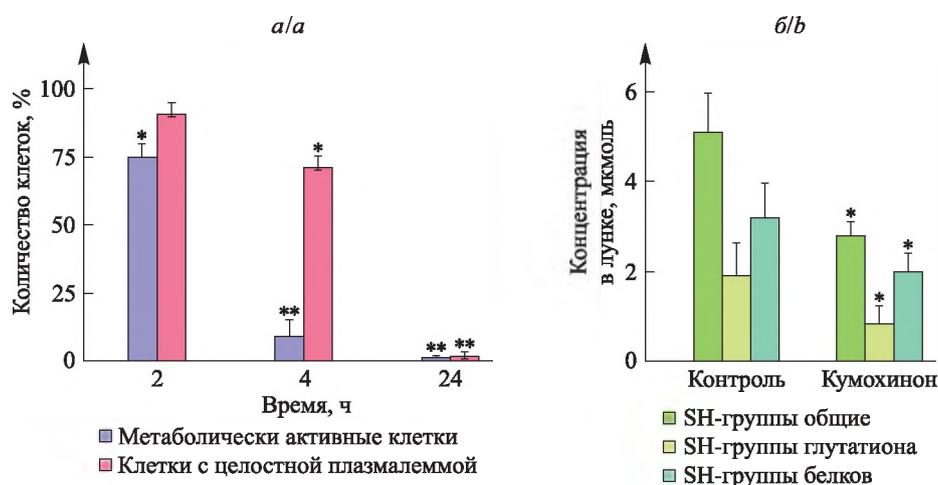


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации кератиноцитов с кумохиноном (200 мкмоль/л) на их жизнеспособность (метаболическую активность) и целостность плазматической мембраны (данные представлены как процент к контролю) (а).

Содержание восстановленного глутатиона и тиоловых групп белков в кератиноцитах через 1 ч инкубации с кумохиноном (200 мкмоль/л) (б).

Звездочкой отмечены значения $p < 0,001$ относительно контроля, двумя звездочками – значения $p < 0,000\,001$ относительно контроля

Fig. 2. Effect of the length of incubation of keratinocytes with cumoquinone (200 $\mu\text{mol/L}$) on their viability (metabolic activity) and plasma membrane integrity (data are presented as a percentage of control) (a).

Content of reduced glutathione and protein thiol groups in keratinocytes after 1 h of incubation with cumoquinone (200 $\mu\text{mol/L}$) (b).

An asterisk indicates values $p < 0.001$ relative to control, two asterisks indicate values $p < 0.000\,001$ relative to control

Существует большое разнообразие методов исследования повреждений структуры ДНК, однако чувствительность и специфичность многих из них оказываются недостаточными для мониторинга повреждений ДНК, вызванных действием внешних факторов, и выявления генопротекторного эффекта потенциальных фармакологических препаратов. По этой причине большой интерес представляет предложенный в 1984 г. метод ДНК-комет (метод гель-электрофореза ДНК отдельных клеток) [12], позволяющий выявлять и анализировать повреждения ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*. С использованием метода ДНК-комет в данной работе было исследовано состояние ядерной ДНК кератиноцитов человека через 2 ч инкубации с кумохиноном в диапазоне концентраций 50–200 мкмоль/л (рис. 3).

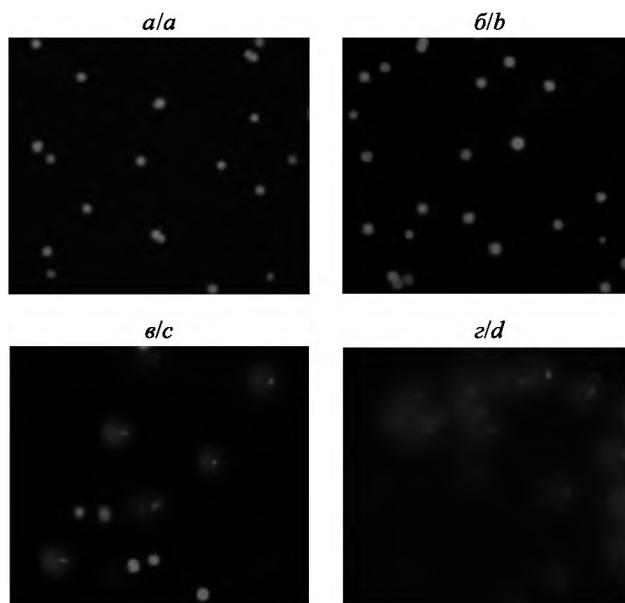


Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток HaCaT (a) и культивируемых клеток HaCaT через 2 ч инкубации с кумохиноном в концентрации 50 мкмоль/л (б), 100 мкмоль/л (в) и 200 мкмоль/л (г) (окрашивание этидиумбромидом)

Fig. 3. Representative fluorescent micrographs of DNA comets obtained from control HaCaT cells (a) and cultured HaCaT cells after 2 h of incubation with cumoquinone at a concentration of 50 μmol/L (b), 100 μmol/L (c) and 200 μmol/L (d) (ethidium bromide staining)

Установлено, что инкубация кератиноцитов с кумохиноном в течение 2 ч приводит к появлению клеток с поврежденной ДНК, причем количество таких клеток возрастает с увеличением концентрации кумохинона в культуральной среде (см. рис. 3; табл. 1). Следует отметить, что в клетках с поврежденным хроматином выявлены только атипичные ДНК-кометы. После воздействия кумохинона в концентрации 200 мкмоль/л атипичные ДНК-кометы составляли 99 % всех задокументированных комет (см. рис. 3, г), а после воздействия кумохинона в концентрации 100 мкмоль/л – около 50 %, тогда как остальные кометы по визуальному ранжированию [13] относились только к категории 0 (см. рис. 3, в), т. е. не содержали поврежденную ДНК. При воздействии кумохинона в концентрации 50 мкмоль/л кометы категории 0 составляли практически 100 % (см. рис. 1, б).

Таблица 1

Степень повреждения ядерной ДНК кератиноцитов через 2 ч инкубации с кумохиноном

Table 1

The degree of damage to nuclear DNA of keratinocytes after 2 h of incubation with cumoquinone

| Экспериментальные условия | Процент клеток с фрагментированной ДНК | Процент ДНК в хвосте атипичных ДНК-комет |
|---------------------------|--|--|
| Контроль | 0 ± 0,1 | 0 ± 0,2 |
| Кумохинон (50 мкмоль/л) | 1,0 ± 0,2 | 0 ± 0,2 |
| Кумохинон (100 мкмоль/л) | 49,0 ± 1,4* | 89,3 ± 1,4** |
| Кумохинон (200 мкмоль/л) | 99,0 ± 1,4** | 91,3 ± 1,4** |

* $p < 0,000\,000\,1$ относительно контроля.
 ** $p < 0,000\,000\,001$ относительно контроля.

Атипичные ДНК-кометы, или, как их еще называют, клетки-призраки, облака либо ежи, имеют нестандартную морфологию, при этом общим для них является практически полное отсутствие головы и наличие широкого диффузионного хвоста, содержащего от 70 до 100 % всей ядерной ДНК [14]. Суще-

ствуют различные гипотезы, объясняющие возможность образования атипичных ДНК-комет, но все они предполагают активацию в клетке процессов, ведущих к расщеплению ДНК, в первую очередь развитие окислительного стресса, который приводит к апоптозу и активации ДНК-эндонуклеаз, включая каспазонезависимую эндонуклеазу G [14]. ДНК-кометы, которые могут быть зарегистрированы с помощью цифровой камеры, содержат фрагменты ДНК длиной 10–300 тыс. пар нуклеотидов и характерны для начального этапа апоптоза, в последующем они подвергаются дальнейшему расщеплению до фрагментов, кратных 180–200 парам нуклеотидов, и ввиду слабого свечения уже не детектируются [14].

Значения, приведенные в табл. 2, хорошо согласуются с данными, полученными в работе [15]: через 2 ч после обработки клеток р-нитрофенолом, N-лауроилсаркозином и D-ментолом (веществами, не являющимися генотоксикантами) в цитотоксических концентрациях были выявлены ДНК-кометы с сильно поврежденной ДНК на фоне отсутствия ДНК-комет со средней или низкой степенью повреждения ДНК. Принимая во внимание эти результаты, а также данные, свидетельствующие о развитии окислительного стресса в кератиноцитах человека, подвергнутых воздействию кумохинона, можно сделать вывод о том, что появление атипичных ДНК-комет обусловлено не прямым генотоксическим действием кумохинона, а его способностью продуцировать АФК и влиять на редокс-статус клеток.

Исследование влияния нативного и микроструктурированного кверцетина на цитотоксические эффекты кумохинона в отношении кератиноцитов человека. Клеточная модель, основанная на воздействии кумохинона на кератиноциты, была использована для оценки фармакологической эффективности нативного и микроструктурированного кверцетина в условиях окислительного стресса. С этой целью исследуемые препараты вносили в культуральную среду одновременно с кумохиноном и через 4 ч инкубации оценивали жизнеспособность клеток.

Установлено, что через 4 ч инкубации с кумохиноном количество жизнеспособных клеток снижалось почти на 100 %. Однако, если кератиноциты инкубировались с кумохиноном в присутствии кверцетина или его микроструктурных форм (Кв(РАН/PPS)₄ и Кв(Hit/DS)₄), количество жизнеспособных клеток было существенно больше, чем при инкубации только с кумохиноном (см. табл. 2). При этом защитные эффекты Кв(РАН/PPS)₄ и Кв(Hit/DS)₄ были статистически значимы.

Таблица 2

Влияние кверцетина (50 мкмоль/л) и его микроструктурных форм (50 мкмоль/л по кверцетину) на жизнеспособность кератиноцитов через 4 ч инкубации с кумохиноном (200 мкмоль/л)

Table 2

Effect of quercetin (50 μmol/L) and its microstructured forms (50 μmol/L for quercetin) on the viability of keratinocytes after 4 h of incubation with cumoquinone (200 μmol/L)

| Экспериментальные условия | Количество жизнеспособных клеток, % |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Контроль | 100,0 ± 7,5 |
| Кумохинон | 1,8 ± 4,4* |
| Кумохинон + кверцетин | 12,2 ± 7,6 |
| Кумохинон + Кв(РАН/PPS) ₄ | 23,5 ± 9,2** |
| Кумохинон + Кв(Hit/DS) ₄ | 30,0 ± 11,3*** |

* $p < 0,00001$ относительно контроля.

** $p < 0,01$ относительно кумохинона.

*** $p < 0,001$ относительно кумохинона.

В последующих экспериментах методом ДНК-комет была определена электрофоретическая подвижность ДНК кератиноцитов через 2 ч инкубации с кумохиноном (200 мкмоль/л) в присутствии кверцетина (50 мкмоль/л), Кв(РАН/PPS)₄ или Кв(Hit/DS)₄ (50 мкмоль/л по кверцетину) и без них. Как видно из рис. 4, через 2 ч инкубации с кумохиноном клетки с неповрежденной ДНК практически отсутствовали (см. рис. 4, $\delta - \varepsilon$), тогда как при добавлении в культуральную среду кумохинона и исследуемых препаратов – кверцетина (см. рис. 4, $u - m$), Кв(РАН/PPS)₄ (см. рис. 4, $n - p$) или Кв(Hit/DS)₄ (см. рис. 4, $c - \phi$) – количество клеток с неповрежденной ядерной ДНК составляло 20–30 %.

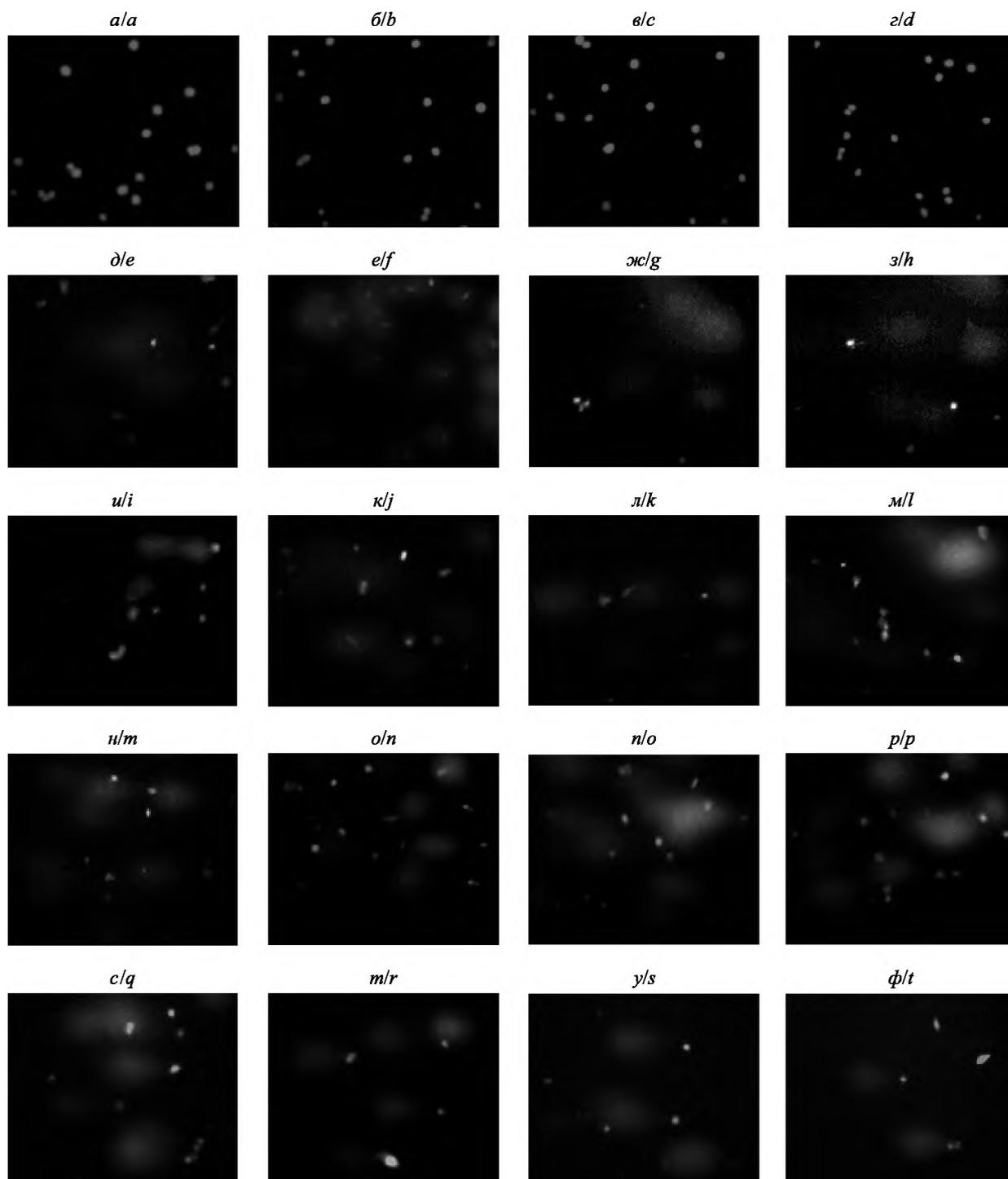


Рис. 4. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток HaCaT (*a–g*) и культивируемых клеток HaCaT через 2 ч инкубации только с кумохиноном (200 мкмоль/л) (*д–з*), с кумохиноном и кверцетином (50 мкмоль/л) (*и–м*), кумохиноном и Кв(РАH/PPS)₄ (50 мкмоль/л) (*н–р*), кумохиноном и Кв(Hit/DS)₄ (50 мкмоль/л) (*с–ф*) (окрашивание этидиумбромидом)

Fig. 4. Representative fluorescent micrographs of DNA comets obtained from control HaCaT cells (*a–d*) and cultured HaCaT cells after 2 h of incubation with cumoquinone only (200 μmol/L) (*e–h*), with cumoquinone and quercetin (50 μmol/L) (*i–l*), with cumoquinone and Kv(РАH/PPS)₄ (50 μmol/L) (*m–p*), with cumoquinone and Kv(Hit/DS)₄ (50 μmol/L) (*q–t*) (Kv – quercetin; ethidium bromide staining)

Таким образом, кверцетин и его микроструктурные формы уменьшают степень повреждения ядерной ДНК кумохином. Хорошо известно, что кверцетин является эффективным антиоксидантом [1]. Поскольку цитотоксическое действие кумохинона обусловлено иницированием окислительного стресса, можно допустить, что выявленные в данной работе эффекты кверцетина и его микроструктурных форм связаны со способностью нейтрализовать АФК и ингибировать свободнорадикальные процессы, ведущие к развитию окислительного стресса и апоптозу. Следует отметить, что микроструктурирование кверцетина увеличивает его биодоступность и повышает эффективность цитопротекторного действия в условиях клеточного окислительного стресса.

Заключение

В настоящем исследовании показано, что кумохинон может быть использован для моделирования окислительного стресса и изучения его последствий в культивируемых клетках. Гибель клеток, повреждение ДНК и появление атипичных ДНК-комет в кератиноцитах человека линии HaCaT, подвергнутых воздействию кумохинона, обусловлены не его генотоксичностью, а развитием окислительного стресса и активацией ДНК-эндонуклеаз. Установлено, что кверцетин оказывает цитопротекторное действие и уменьшает степень повреждения ядерной ДНК в условиях окислительного стресса, инициируемого кумохином. Защитный эффект существенно возрастает при использовании микроструктурированных форм кверцетина, что может быть связано с увеличением его клеточной доступности.

Библиографические ссылки / References

1. Kostyuk VA, Potapovich AI. *Bioradicals and bioantioxidants*. Minsk: Belarusian State University; 2004. 179 p. Russian.
2. Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(30):3943–3965. DOI: 10.2174/092986709789352312.
3. Zou Y, Qian Y, Rong X, Cao K, McClements DJ, Hu K. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*. 2021;120:106980. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106980.
4. O'Brien PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 1991;80(1):1–41. DOI: 10.1016/0009-2797(91)90029-7.
5. Potapovich AI, Ignatovich LV, Kostyuk VA, Shadyro OI. Effect of oxygen level on the cytotoxic effect of doxorubicin and thymoquinone. *News of Biomedical Sciences*. 2021;21(4):167–172. Russian.
6. Moore GA, Rossi L, Nicotera P, Orrenius S, O'Brien PJ. Quinone toxicity in hepatocytes: studies on mitochondrial Ca²⁺ release induced by benzoquinone derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1987;259(2):283–295. DOI: 10.1016/0003-9861(87)90495-4.
7. Potapovich A, Kostyuk V. Cell-cell death communication by signals passing through non-aqueous environments. *Results in Chemistry*. 2021;3:100107. DOI: 10.1016/j.rechem.2021.100107.
8. Shadyro OI, Edimecheva IP, Glushonok GK, Ostrovskaya NI, Polozov GI, Murase H, et al. Effects of phenolic compounds on reactions involving various organic radicals. *Free Radical Research*. 2003;37(10):1087–1097. DOI: 10.1080/10715760310001600417.
9. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988;175(1):184–191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
10. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000;35(3):206–221. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
11. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75(5):2178–2189. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0752178.x.
12. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123:291–298. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x.
13. Filippov EV. Using the «DNA comet» method to detect and assess the degree of DNA damage in the cells of plants, animals and humans caused by environmental factors. *Nauka i obrazovanie*. 2014;2:72–78. Russian. EDN: SUFCTF.
14. Zhanataev AK, Anisina EA, Chayka ZV, Miroshkina IA, Durnev AD. Phenomenon of atypical DNA comets. *Tsitologiya*. 2017;59(3):163–168. Russian.
15. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*. 1997;90:183–188. DOI: 10.1016/S0378-4274(96)03847-7.

Получена 30.04.2024 / исправлена 03.05.2024 / принята 21.05.2024.
Received 30.04.2024 / revised 03.05.2024 / accepted 21.05.2024.

Авторы:

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Владимировна Костюк – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории органических композиционных материалов.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, профессор, заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Tatyana V. Kostyuk, researcher at the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Tatsiana G. Shutava, PhD (chemistry), docent; leading researcher at the laboratory of organic composite materials.

shutova@ichnm.basnet.by

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), full professor; head of the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 57.033

ОЦЕНКА ЭНДОГЕННОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА БЕЛОРУССКИХ СОРТОВ ПИВА ПРИ ЕГО ХРАНЕНИИ В РАЗЛИЧНОЙ УПАКОВКЕ

А. А. РУСАКОВИЧ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. При длительном хранении пива в нем развиваются окислительные процессы, приводящие к ухудшению качества напитка. В основе этого лежит генерация активных форм кислорода, которая может вызываться диффузией кислорода через элементы упаковки либо преобразованием внутренних кислородсодержащих источников. Для анализа свободнорадикальных процессов в пиве в последние годы активно используется спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Она позволяет оценить окислительную стабильность пива по так называемому эндогенному антиоксидантному потенциалу, величина которого коррелирует со временем хранения и вкусовыми качествами напитка. Одним из важнейших вопросов в пивной индустрии является эффективность различных видов изолирующей упаковки в отношении окислительных процессов. Имеется ряд работ, указывающих на то, что жестяная банка и стеклянная бутылка обеспечивают лучшую сохранность пива по сравнению с полиэтиленовой бутылкой. Однако неясно, связано ли это с окислительными явлениями. В представленной работе с использованием адаптированных методов ЭПР-спектроскопии на базе ЭПР-спектрометра белорусского

Образец цитирования:

Русакович АА, Демидчик ВВ. Оценка эндогенного антиоксидантного потенциала белорусских сортов пива при его хранении в различной упаковке. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:55–62.
EDN: OEAXLC

For citation:

Rusakovich AA, Demidchik VV. Assessment of the endogenous antioxidant potential of Belarusian beers during its storage in different packaging. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:55–62. Russian.
EDN: OEAXLC

Авторы:

Алина Андреевна Русакович – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, декан биологического факультета.

Authors:

Alina A. Rusakovich, junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
aalinarusakovich@gmail.com

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor, dean of the faculty of biology.
dzemidchik@bsu.by



производства были выявлены отличия в величине эндогенного антиоксидантного потенциала как для различных сортов пива, так и для разных типов упаковки (полиэтиленовая бутылка, стеклянная бутылка и жестяная банка). Показано, что пиво, хранящееся в полиэтиленовой бутылке, имеет значительно более низкий эндогенный антиоксидантный потенциал, чем пиво, хранящееся в стеклянной бутылке. Кроме того, установлено, что окислительные характеристики одного и того же сорта пива, хранящегося в жестяной банке и стеклянной бутылке, не отличаются.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс; спиновые ловушки; свободные радикалы; окисление пива.

Благодарность. Авторы выражают признательность ЗАО «Адвин Сمارт Фэктори» за техническую поддержку при проведении исследования, а также менеджеру по развитию производства ОАО «Криница» И. С. Чернышеву за предоставление образцов для анализа.

ASSESSMENT OF THE ENDOGENOUS ANTIOXIDANT POTENTIAL OF BELARUSIAN BEERS DURING ITS STORAGE IN DIFFERENT PACKAGING

A. A. RUSAKOVICH^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. A. Rusakovich (aalinarusakovich@gmail.com)

Abstract. During long-term storage, oxidative processes develop in beer, leading to a deterioration in the quality of this drink. This is based on the production of reactive oxygen species, which can be caused by the diffusion of oxygen through packaging elements or transformation of internal oxygen-containing sources. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy has been actively used in recent years to analyse free radical processes in beer. It allows to evaluate the oxidative stability of beer by the so-called endogenous antioxidant potential, the value of which correlates with storage time and taste of the drink. One of the most important issues in the beer industry is the effectiveness of various types of insulating packaging in relation to oxidative processes. There are a number of studies indicating better preservation of beer in a can and glass bottle compared to a polyethylene bottle. However, it is not clear whether this is due to oxidative phenomena. In the presented work, using adapted EPR spectroscopy methods based on the EPR spectrometer manufactured in Belarus, differences in the value of endogenous antioxidant potential were identified for both different types of beer and different types of packaging (polyethylene bottle, glass bottle and can). Beer stored in a polyethylene bottle has been shown to have a significantly lower endogenous antioxidant potential compared to beer stored in a glass bottle. It was also found that the oxidation characteristics of the same type of beer stored in a can and a glass bottle do not differ.

Keywords: electron paramagnetic resonance; spin traps; free radicals; beer oxidation.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to CJSC «Advin Smart Factory» for technical support during the research, as well as to the production development manager of OJSC «Krinitsa» I. S. Chernyshev for providing samples for analysis.

Введение

Пиво является одним из наиболее распространенных алкогольных напитков в мире, а также лидером по объемам производимой продукции в биотехнологии [1; 2]. Употребление пива, которое по сравнению с водкой и вином отличается низким содержанием алкоголя, имеет значительный социальный эффект, так как оно заменяет, в особенности в странах Восточной Европы, более крепкие спиртные напитки [3]. В настоящее время в мире существуют десятки тысяч сортов пива, а его потребление находится на стабильно высоком уровне, продолжая расти, что связано с увеличением ассортимента, разработкой новых рецептов и отказом потребителей от других алкогольных напитков [4].

В состав пива входят ряд органических соединений (включая органические кислоты, аминокислоты, сахара, полисахариды, спирты), определяющих его вкусовые качества [5; 6]. Проведенные исследования также показывают, что пиво содержит значительное количество полезных для человека веществ, таких как витамины, антиоксиданты, микроэлементы и др. [5; 7]. Как и в других продуктах питания, в пиве при хранении происходят окислительные реакции, приводящие к ухудшению его качества и полезных свойств [8; 9]. Срок годности пива в значительной степени определяется скоростью протекания данных процессов.

В основе окислительных превращений в пиве лежат генерация активных форм кислорода (АФК) и накопление окисленных производных органических соединений [10]. Проблема увеличения срока годности пива, сохранения свежести вкуса и поддержания антиоксидантной активности напитка является одной из важнейших в пивной индустрии. В последние годы высказаны предположения о том, что окислительные процессы в пиве связаны с его насыщением избытком кислорода при производстве, а также с проникновением кислорода через упаковку [11]. Тем не менее данные предположения пока не подкреплены экспериментальными доказательствами.

Для регистрации и описания свободных радикалов в различных разделах биологии и химии, в том числе при анализе окислительных процессов, происходящих в пиве, широко применяется спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [12–14]. Под ЭПР понимают поглощение электромагнитного излучения определенной частоты парамагнитным веществом (электронами), помещенным в постоянное магнитное поле [15]. Согласно квантово-механической модели заряженные свободные электроны вращаются вокруг своей оси, что приводит к возникновению магнитного момента, или спина. Спин может находиться в двух ориентациях относительно магнитного поля – параллельной и антипараллельной. Для каждой из ориентаций характерен разный уровень энергии. Поглощая микроволновое излучение, спин может переходить с одного энергетического уровня на другой. Резонанс возникает в результате совпадения энергии излучения с энергией, необходимой для перехода [16]. Уменьшению мощности излучения при резонансе соответствует сигнал, который регистрируется, обрабатывается и представляется в виде первой производной кривой поглощения (ЭПР-спектра). Для количественной характеристики сигнала применяется двойное интегрирование первой производной ЭПР-спектра [17]. Регистрация ЭПР-спектров осуществляется ЭПР-спектрометрами. В последние годы производство доступных по цене ЭПР-спектрометров налажено в Беларуси ЗАО «Адвин Смарт Фэктори». Адаптация данных приборов под исследование окислительных процессов и эндогенного антиоксидантного потенциала (ЭАП) пива представляется весьма актуальной задачей.

Использование метода ЭПР-спектроскопии сопряжено с рядом трудностей, в частности с тем, что радикальные молекулы быстро распадаются или вступают во взаимодействия с другими молекулами биологических систем [17]. Данная особенность делает концентрацию свободных радикалов непостоянной и затрудняет их прямое определение. Для анализа короткоживущих свободных радикалов применяются так называемые спиновые ловушки. В качестве них чаще всего используются нитронные соединения или нитрозосоединения, специфично реагирующие со свободными радикалами [18]. В результате взаимодействия свободного радикала и спиновой ловушки формируются долгоживущие стабильные парамагнитные аддукты, т. е. радикальные молекулы, которые могут длительное время регистрироваться ЭПР-спектрометром [19].

Для изучения процессов окисления в пиве в основном используются такие спиновые ловушки, как α -фенил-N-трет-бутилнитрон (PBN) и α -4-пиридил-1-оксид-N-трет-бутилнитрон (POBN) [20]. Они формируют стабильные аддукты с гидроксильным и другими радикалами [21]. Для анализа ЭАП пива первой была разработана методика на основе PBN, которая активно применяется до настоящего времени. PBN имеет низкую цену, однако, как выяснилось, не обладает высокой селективностью и доступностью в водной фазе [22]. В последние годы использование PBN также критикуется некоторыми авторами ввиду генерации артефактов, связанных с редокс-активностью самого PBN [10]. Применение POBN в качестве альтернативы PBN имеет большие перспективы, так как позволяет повысить чувствительность измерения, исключает ряд артефактов и лучше подходит для водных систем. Немаловажно, что, несмотря на более высокую по сравнению с PBN стоимость, POBN при проведении опытов требуется в более низкой концентрации.

Целью настоящей работы являлась адаптация методов ЭПР-спектроскопии в комбинации со спиновой ловушкой к измерению ЭАП белорусских сортов пива, разлитых в различные типы упаковки, с использованием ЭПР-спектрометра отечественного производства.

Материалы и методы исследования

Измерения выполнялись на сортах пива «Крыніца. Моцнае», «Жигулевское», «Brauberg», «Золото пивовара» производства ОАО «Криница» (Беларусь), разлитых в тару разного типа. Использовались образцы одной даты производства, приобретенные в различных пунктах продажи. Исследования проводились на 30-й день с даты изготовления.

Окислительная стабильность отобранных образцов изучалась на основе методики искусственного старения пива при повышенной температуре [9]. Сначала образцы подвергались дегазации (устранение CO_2) путем центрифугирования (10 000 об/мин (или 11 180 g), 10 мин, 22 °C) в стерильных пробирках объемом 15 мл с открытой крышкой (объем пробы составлял 10 мл). После дегазации пробирки плотно закрывались, чтобы препятствовать притоку кислорода из воздуха. В дегазированные образцы добавлялась

спиновая ловушка POBN (*Sigma-Aldrich*, США) в конечной рабочей концентрации 3 ммоль/л, после чего выполнялось инкубирование на термошейкере (250 об/мин, 300 мин, 60 °С). Спустя определенные промежутки времени осуществлялись отбор 50 мкл образца и регистрация его ЭПР-спектра. Для проведения ЭПР-анализа образец помещался в стеклянный капилляр (*Blaubrand*, Германия), который закупоривался инертным воском и погружался в резонатор ЭПР-спектрометра SpinscanX (ЗАО «Адвин Сمارт Фэктори», Беларусь). При регистрации ЭПР-спектров использовались следующие параметры: частота модуляции – 100 000 Гц, центр поля – 336 мТл, ширина развертки – 6 мТл, время записи – 60 с, временная константа – 0,046 с, амплитуда модуляции – 100 мкТл. Анализ полученных спектров проводился в программе *e-Spinoza*. Для обработки результатов использовались стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ) и ошибка средней величины ($S\bar{x}$). Для количественной характеристики сигнала применялось двойное интегрирование первой производной ЭПР-спектра. Значение ЭАП определялось по точке перегиба кинетической кривой накопления спинового аддукта при нагревании образцов пива (рис. 1) [9].

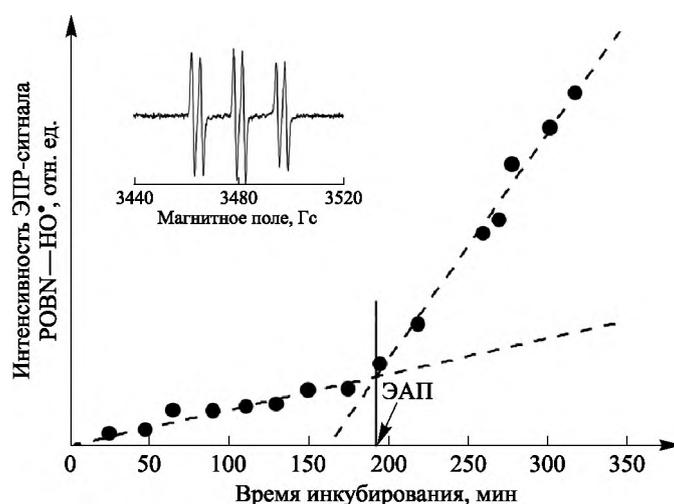


Рис. 1. Изменение интенсивности ЭПР-сигнала спинового аддукта POBN—HO• в образце пива в зависимости от времени инкубирования

Fig. 1. Change in the intensity of the electron paramagnetic resonance (EPR) signal of the spin adduct POBN—HO• in the sample of beer depending on the incubation time

Присутствующие в пиве эндогенные антиоксиданты способны ингибировать образование в нем свободных радикалов в течение длительного времени [22]. После истощения антиоксидантов количество свободных радикалов лавинообразно нарастает, и происходит формирование аддуктов свободных радикалов со спиновой ловушкой, приводящее в экспериментальных условиях к увеличению интенсивности ЭПР-сигнала (см. рис. 1) [23]. Соответственно, чем больше значение ЭАП и ниже интенсивность образования спиновых аддуктов в образце, тем выше антиоксидантный потенциал образца, т. е. устойчивость к окислению и стабильность вкуса пива [22].

Результаты и их обсуждение

В ходе работы были получены кривые зависимости интенсивности ЭПР-сигнала спинового аддукта POBN—HO• от времени инкубирования образцов при повышенной температуре (60 °С), т. е. в условиях искусственного старения, для трех сортов пива, хранившихся в полиэтиленовых (ПЭТ) и стеклянных бутылках (рис. 2). Как следует из полученных данных, все сорта реагировали на искусственное старение увеличением количества свободнорадикальных аддуктов POBN—HO•. Однако этот эффект развивался значительно быстрее в случае хранения пива в ПЭТ-упаковке. Так, у сортов пива «Крыніца. Моцнае», «Жигулевское» и «Brauberg», разлитых в ПЭТ-бутылки, отсутствовала лаг-фаза в накоплении свободных радикалов, обычно предшествующая пику, связанному с накоплением радикалов при искусственном старении (см. рис. 1 и 2). Таким образом, сорта пива «Крыніца. Моцнае», «Жигулевское» и «Brauberg», хранившиеся в ПЭТ-бутылках, вероятно, прошли полный процесс старения за 30 дней и не обладали антиоксидантной способностью. Отсутствие лаг-фазы наблюдалось также и для образца пива

сорта «Brauberg» из стеклянной бутылки, что может указывать на возможное обогащение кислородом на заключительных этапах производства этого пива. Тем не менее в отличие от образца того же сорта из ПЭТ-бутылки кривая для данного образца из стеклянной тары характеризовалась невысокими значениями интенсивности накопления спиновых аддуктов в процессе старения. Соответственно, стеклянная упаковка предохраняла это пиво от снижения ЭАП, т. е. продлевала срок его годности. Согласно литературным данным существует прямая корреляция между ЭАП и вкусовыми и органолептическими свойствами пива [24]. В настоящей работе подобные тесты не проводились, так как они требуют наличия обученных и аттестованных специалистов.

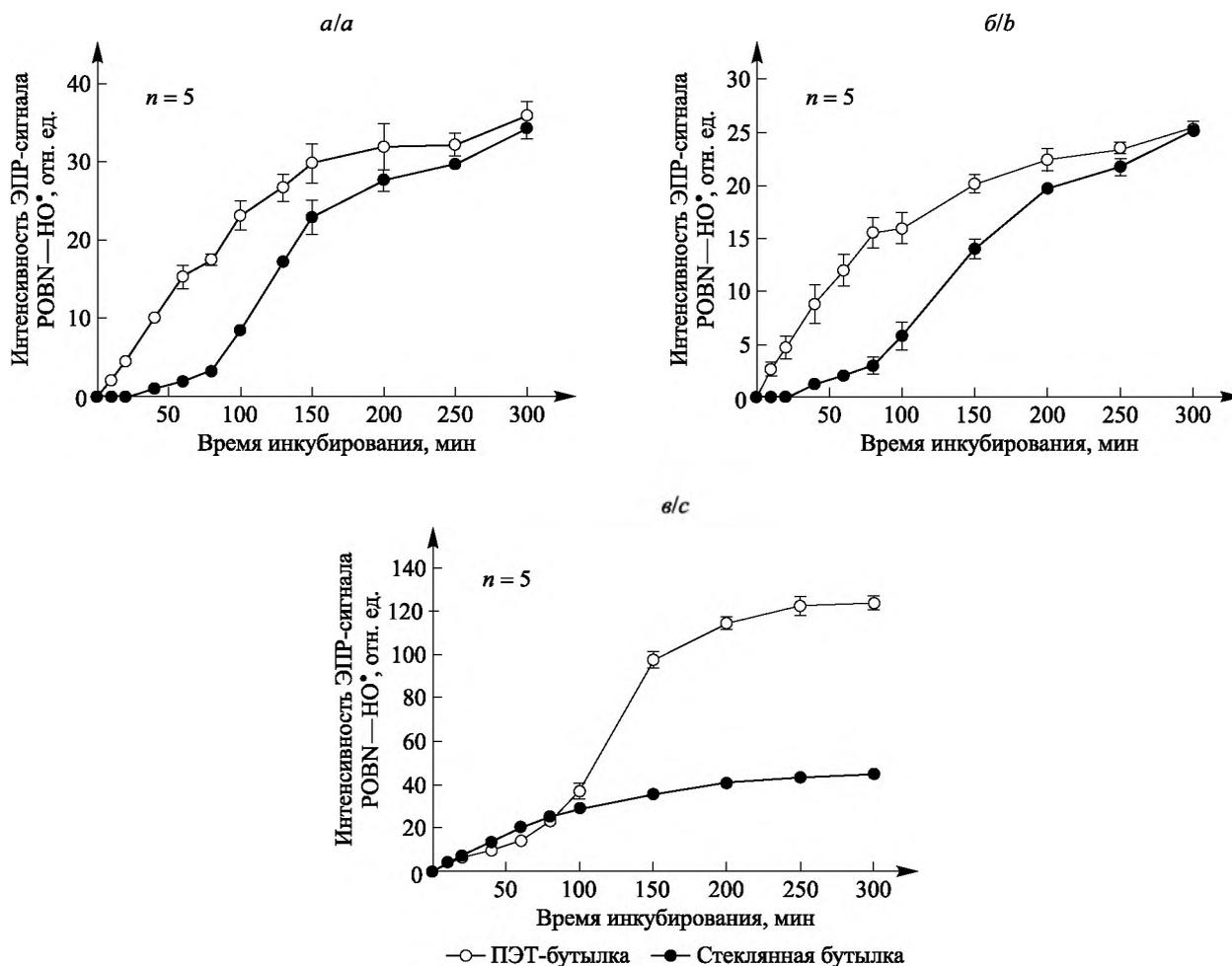


Рис. 2. Изменение интенсивности ЭПР-сигнала спинового аддукта POBN—НО[•] в образцах пива сортов «Крыніца. Моцнае» (а), «Жигулевское» (б), «Brauberg» (в) в зависимости от времени инкубирования

Fig. 2. Change in the intensity of the EPR signal of the spin adduct POBN—НО[•] in the samples of beers «Krynitsa. Strong» (a), «Zhigulevskoe» (b), «Brauberg» (c) depending on the incubation time

Проведенные опыты показали, что кинетическая кривая накопления спиновых аддуктов в образцах пива сортов «Крыніца. Моцнае» и «Жигулевское» в начале инкубирования характеризовалась выраженной лаг-фазой и резким увеличением интенсивности ЭПР-сигнала на определенном этапе инкубирования (см. рис. 2). Интенсивность ЭПР-сигнала на завершающем этапе инкубирования достигала значений, аналогичных значениям для образцов из ПЭТ-тары. Данный факт указывает на то, что общее количество органического вещества в протестированных образцах пива было приблизительно одинаковым, но образцы, находившиеся в течение 30 дней в стеклянной таре, намного лучше сохранили ЭАП, чем образцы, которые хранились в ПЭТ-упаковке.

В работе также были получены кривые зависимости интенсивности ЭПР-сигнала спинового аддукта POBN—НО[•] для сорта пива «Золото пивовара», разлитого в стеклянную бутылку и жестяную банку (рис. 3). Согласно информации, доступной на веб-сайте ОАО «Криница», это пиво производится по особым рецептурам на новейшем оборудовании из лучшего зарубежного солода.

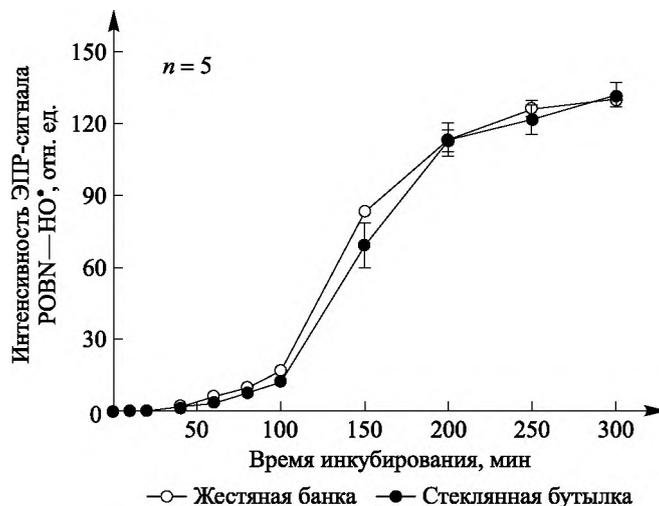


Рис. 3. Изменение интенсивности ЭПР-сигнала спинового аддукта POBN—HO[•] в образце пива сорта «Золото пивовара» в зависимости от времени инкубирования

Fig. 3. Change in the intensity of the EPR signal of the spin adduct POBN—HO[•] in the sample of beer «Zoloto pivovara» depending on the incubation time

Для сорта «Золото пивовара» была характерна высокая интенсивность образования свободных радикалов после завершения лаг-фазы, что указывает на изначальную насыщенность данного пива неразложившимися органическими веществами с антиоксидантными свойствами. Примечательно, что значения интенсивности ЭПР-сигнала POBN—HO[•] в образцах пива «Золото пивовара» из стеклянной бутылки и жестяной банки не имели достоверных отличий. Таким образом, затемненная стеклянная бутылка (коричневое стекло) и жестяная банка демонстрировали приблизительно одинаковый уровень защиты от окисления для одного и того же сорта пива. Эти данные указывают на то, что свет, проникающий через затемненное стекло, не влияет на процессы окисления, и эффективность упаковки главным образом связана с предотвращением поступления кислорода.

Кроме того, для всех образцов был определен уровень ЭАП (рис. 4). Самым высоким ЭАП среди протестированных образцов обладал сорт «Золото пивовара» – 89 мин в жестяной банке и 95 мин в стеклянной бутылке. Для сорта «Крыніца. Моцнае» ЭАП составил 80 мин, для сорта «Жигулевское» – 77 мин. Согласно литературным данным это достаточно высокие значения, указывающие на хорошее качество производимого пива [22].

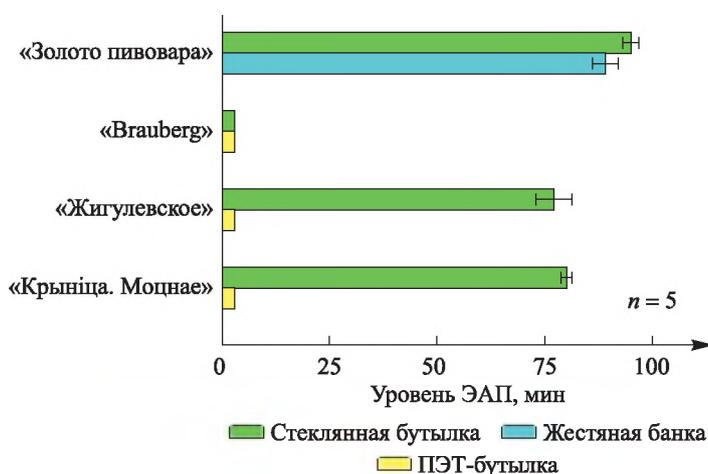


Рис. 4. Уровень ЭАП образцов пива сортов «Золото пивовара», «Brauberg», «Жигулевское», «Крыніца. Моцнае» из различной упаковки

Fig. 4. Level of endogenous antioxidant potential of samples of the beers «Zoloto pivovara», «Brauberg», «Zhigulevskoe», «Krynitsa. Strong» from various packaging

Продемонстрированные в настоящей работе низкая сохранность пива и падение его антиоксидантной способности в ПЭТ-упаковке согласуются с недавно полученными метаболомными данными [25–27]. Метаболомные исследования показывают, что при длительном хранении пива появляется пул более окисленных форм органических кислот и аминокислот (было заметно и в представленной работе). Одними из ключевых радикальных компонентов, которые образуются в пиве при его старении, являются карбонильные соединения. Данные вещества формируются в ходе реакций карбонилирования, катализируемых АФК [28], в результате встраивания радикализированных фрагментов органических соединений различной природы, инициируемых наиболее реакционно-активными АФК, главным образом гидроксильными радикалами. Накопление карбонилированных форм органических соединений изменяет вкус напитка: он приобретает так называемый картонный привкус, характерный для несвежего пива [28]. Карбонильные соединения образуются и при искусственном старении пива. Примечательно также, что ЭПР-спектрометр белорусского производства показал схожую эффективность и чувствительность измерения с широко используемыми приборами производства компаний *Bruker* (Германия) и *Nippon Denshi* (Япония) [29–31].

Заключение

В настоящем исследовании с использованием метода ЭПР-спектроскопии в присутствии спиновой ловушки POBN проведена оценка влияния типа упаковки пива на его ЭАП. Кинетический анализ накопления спиновых аддуктов в условиях ускоренного старения пива показал, что стеклянная и жестяная тара обеспечивает одинаковый уровень защиты напитка от окисления и способствует более длительному сохранению его окислительной стабильности. В то же время ПЭТ-упаковка неэффективно защищает пиво от окисления. Также можно заключить, что свет, проникающий через затемненное стекло, не влияет на процессы разложения и окисления пива, так как не наблюдалось разницы в окислении образцов напитка из стеклянной бутылки и жестяной банки. Соответственно, упаковка главным образом препятствует проникновению в пиво кислорода.

Библиографические ссылки / References

1. Piornos JA, Koussissi E, Balagiannis DP, Brouwer E, Parker JK. Alcohol-free and low-alcohol beers: aroma chemistry and sensory characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2023;22(1):233–259. DOI: 10.1111/1541-4337.13068.
2. Chen Xiaodie, Song Chuan, Zhao Jian, Xiong Zhuang, Peng Lianxin, Zou Liang, et al. Application of strain selection technology in alcoholic beverages: a review. *Foods*. 2024;13(9):1396. DOI: 10.3390/foods13091396.
3. Anderson P, Kokole D, Llopis EJ, Burton R, Lachenmeier DW. Lower strength alcohol products – a realist review-based road map for European policy making. *Nutrients*. 2022;14(18):3779. DOI: 10.3390/nu14183779.
4. Poelmans E, Swinnen JFM. A brief economic history of beer. In: Swinnen JFM, editor. *The economics of beer*. Oxford: Oxford University Press; 2011. p. 3–28. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199693801.003.0001.
5. Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Rezaei K. Health-related aspects of beer: a review. *International Journal of Food Properties*. 2012;15(2):350–373. DOI: 10.1080/10942912.2010.487627.
6. Tirado-Kulieva VA, Hernández-Martínez E, Minchán-Velayarce HH, Pasapera-Campos SE, Luque-Vilca OM. A comprehensive review of the benefits of drinking craft beer: role of phenolic content in health and possible potential of the alcoholic fraction. *Current Research in Food Science*. 2023;6:100477. DOI: 10.1016/j.crf.2023.100477.
7. Humia BV, Santos KS, Barbosa AM, Sawata M, Mendonça MC, Padilha FF. Beer molecules and its sensory and biological properties: a review. *Molecules*. 2019;24(8):1568. DOI: 10.3390/molecules24081568.
8. Karabín M, Rýparová A, Jelinek L, Kunz T, Wietstock P, Methner F-J, et al. Relationship of iso- α -acid content and endogenous antioxidative potential during storage of lager beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2014;120(3):212–219. DOI: 10.1002/jib.140.
9. Kunz T, Woest H, Lee E-J, Müller C, Methner F-J. Improvement of the oxidative wort and beer stability by increased unmalted barley proportion. *Brewing Science*. 2011;64(7–8):75–82.
10. Stasko A, Rapta P, Malik F. Charakterisierung der Bierstabilität mit Hilfe von Radikalfängern (eine EPR-Studie). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2000;53(1–2):4–7.
11. Elshani A, Hoxha I, Kongoli R. *Role of oxygen in beer production and quality*. [S. l.]: Éditions universitaires européennes; 2016. 52 p.
12. Polovka M. EPR spectroscopy: a tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006;45(1):1–11.
13. Goodman BA, Yeretian C, Stolze K, Wen D. Quality aspects of coffees and teas: application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to the elucidation of free radical and other processes. *Agricultural Sciences*. 2013;4(8):433–442. DOI: 10.4236/as.2013.48058.
14. Villamena FA. *Reactive species detection in biology: from fluorescence to electron paramagnetic resonance spectroscopy*. Amsterdam: Elsevier; 2016. X, 330 p.
15. Sahu ID, Lorigan GA. EPR techniques, spin labeling and spin trapping. In: Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M, editors. *Encyclopedia of analytical science*. 3rd edition. Amsterdam: Elsevier; 2019. p. 315–327. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14080-6.
16. Brückner A. *In situ* electron paramagnetic resonance: a unique tool for analyzing structure – reactivity relationships in heterogeneous catalysis. *Chemical Society Reviews*. 2010;39(12):4673–4684. DOI: 10.1039/b919541f.
17. Rhodes CJ. Electron spin resonance. Part one: a diagnostic method in the biomedical sciences. *Science Progress*. 2011;94(1):16–96. DOI: 10.3184/003685011X12982218769939.

18. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 5th edition. Oxford: Oxford University Press; 2015. XXXVIII, 905 p. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
19. Mertens T, Kunz T, Gibson BR. Transition metals in brewing and their role in wort and beer oxidative stability: a review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2022;128(3):77–95. DOI: 10.1002/jib.699.
20. Kroneck PMH. Multiheme proteins and enzymes: from spectroscopy to three-dimensional structure. In: *Abstracts of the 5th Workshop on EPR applications in biology and medicine; 2001 September 29 – October 3; Krakow, Poland*. [S. l.]: [s. n.]; 2001. p. 39.
21. Hanson G, Berliner L, editors. *Metals in biology: applications of high-resolution EPR to metalloenzymes*. New York: Springer; 2010. XIX, 419 p. (Biological magnetic resonance; volume 29). DOI: 10.1007/978-1-4419-1139-1.
22. Kunz T, Methner F-J, Huttermann J, Kappl R, inventors; Technische Universität Berlin, assignee. *Method for determining the endogenous antioxidative potential of beverages by means of ESR spectroscopy*. United States patent US 2008/0248580 A1. 2008 October 9.
23. Andersen ML, Skibsted LH. ESR spectroscopy for the study of oxidative processes in food and beverages. In: Webb GA, editor. *Modern magnetic resonance*. Dordrecht: Springer; 2008. p. 1861–1866. DOI: 10.1007/1-4020-3910-7_212.
24. Uchida M, Suga S, Ono M. Improvement for oxidative flavor stability of beer – rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1996;54(4):205–211. DOI: 10.1094/ASBCJ-54-0205.
25. Porcu MC, Fadda A, Sanna D. Lag time determinations in beer samples. Influence of alcohol and PBN concentration in EPR spin trapping experiments. *Oxygen*. 2022;2(4):605–615. DOI: 10.3390/oxygen2040040.
26. Cortés N, Kunz T, Furukawa Suárez A, Hughes P, Methner F-J. Development and correlation between the organic radical concentration in different malt types and oxidative beer stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2010;68(2):107–113. DOI: 10.1094/ASBCJ-2010-0412-01.
27. Polak J, Bartoszek M, Stanimirova I. A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. *Food Chemistry*. 2013;141(3):3042–3049. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.133.
28. Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, Derdelinckx G. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*. 2006;95(3):357–381. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.006.
29. Fromuth K, Chaparro JM, Sedin D, Van Buiten C, Prenni JE. Characterizing the impact of package type on beer stability. *ACS Food Science and Technology*. 2023;3(4):616–625. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.2c00351.
30. Wietstock PC, Glattfelder R, Garbe L-A, Methner F-J. Characterization of the migration of hop volatiles into different crown cork liner polymers and can coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(13):2737–2745. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00031.
31. de Lima AC, Aceña L, Mestres M, Boqué R. Monitoring the evolution of the aroma profile of lager beer in aluminium cans and glass bottles during the natural ageing process by means of HS-SPME/GC-MS and multivariate analysis. *Molecules*. 2023;28(6):2807. DOI: 10.3390/molecules28062807.

Получена 29.05.2024 / исправлена 29.05.2024 / принята 31.05.2024.
Received 29.05.2024 / revised 29.05.2024 / accepted 31.05.2024.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.2

9-*цис*-ЭПОКСИКАРОТИНОИДДИОКСИГЕНАЗА КАК ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЬ СВЯЗАННЫХ С ИММУНИТЕТОМ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАСТЕНИЙ *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Е. С. СТЕПАНОВА¹⁾, Г. В. КУКРЕШ¹⁾,
Е. А. НИКОЛАЙЧИК¹⁾, А. В. КОЛУБАКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Установлено, что снижение экспрессии гена *NCED3* вызывает уменьшение размеров растений *Solanum lycopersicum* и повышает их восприимчивость к заражению патогеном *Pectobacterium versatile*. Выявлено изменение экспрессии генов салицилатной сигнализации: возросла экспрессия генов сигнального белка NPR5 и защитного белка PR1a. Также отмечено, что повысилась экспрессия генов защитных белков PR3, PR5, PR10 и транскрипционного фактора WRKY65, а экспрессия гена защитного белка PR2 стала чувствительной к штамму патогена.

Образец цитирования:

Степанова ЕС, Кукреш ГВ, Николайчик ЕА, Колубако АВ. 9-*цис*-Эпоксикаротиноиддиоксигеназа как переключатель связанных с иммунитетом сигнальных путей растений *Solanum lycopersicum*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:63–71. EDN: NYDQXM

For citation:

Stepanova ES, Kukresh GV, Nikolaichik YA, Kalubaka NV. 9-*cis*-Epoxy-carotenoid dioxygenase as a switch of immunity-related signalling pathways in *Solanum lycopersicum* plants. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:63–71. Russian. EDN: NYDQXM

Авторы:

Елизавета Сергеевна Степанова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Колубако.
Глафира Васильевна Кукреш – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Колубако.
Евгений Артурович Николайчик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.
Анастасия Вячеславовна Колубако – заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Elizaveta S. Stepanova, student at the faculty of biology. lisapersi@yandex.by
Glafira V. Kukresh, student at the faculty of biology. glafira.kukresh@yandex.by
Yevgeny A. Nikolaichik, PhD (biology), docent; head of the department of molecular biology, faculty of biology. yevgenynikolaichik@gmail.com
Nastassia V. Kalubaka, head of the laboratory of transgene plants, department of molecular biology, faculty of biology. kolubakoav@yandex.by



На основании полученных результатов высказано предположение о том, что ген *NCED3* обеспечивает устойчивость растений томата к пектобактериозу, сдерживая салицилатный сигнальный путь, приводящий к активации реакции сверхчувствительности.

Ключевые слова: 9-*cis*-эпоксикаротиноиддигидроксигеназа; *Solanum lycopersicum*; *Pectobacterium versatile*; иммунитет растений.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № B22M-053).

9-*cis*-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE AS A SWITCH OF IMMUNITY-RELATED SIGNALLING PATHWAYS IN *SOLANUM LYCOPERSICUM* PLANTS

E. S. STEPANOVA^a, G. V. KUKRESH^a,
Y. A. NIKOLAICHIK^a, N. V. KALUBAKA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: N. V. Kalubaka (kolubakoav@yandex.by)

Abstract. It has been established that reduced expression of the *NCED3* gene causes a decrease in the size of *Solanum lycopersicum* plants and increases their susceptibility to *Pectobacterium versatile* infection. A change in the expression of salicylate signalling genes was revealed: the expression of the genes for the signalling protein NPR5 and the pathogenesis-related protein PR1a increased. It was also noted that the expression of the genes for the pathogenesis-related proteins PR3, PR5, PR10 and the transcription factor WRKY65 increased, and the expression of the gene for the pathogenesis-related protein PR2 became sensitive to the pathogen strain. Based on the results obtained, it was suggested that the *NCED3* gene provides resistance to pectobacteriosis in tomato plants by inhibiting the salicylate signalling pathway, leading to activation of the hypersensitive response.

Keywords: 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; *Solanum lycopersicum*; *Pectobacterium versatile*; plant immunity.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B22M-053).

Введение

Пектобактерии – некротрофные патогены с широким кругом растений-хозяев. Факторами их вирулентности являются гидролитические ферменты, транспортируемые через систему секреции типа II [1], а также эффекторный белок, доставляемый в клетку растения-хозяина посредством системы секреции типа III и вызывающий изменения в его иммунной сигнализации в свою пользу, что способствует колонизации растения [2]. Пектобактерии выступают возбудителями черной ножки (стеблевой гнили) и мягкой гнили клубней и корнеплодов. Риск развития этих заболеваний повышает переувлажненность (избыточный полив, неблагоприятные погодные условия во время вегетации или нарушение режима хранения клубней). Пектобактериозы продолжают распространяться и регистрироваться в разных частях планеты [3; 4].

Важнейшим гормоном, регулирующим ответную реакцию растений на стрессы абиотической и биотической природы, является абсцизовая кислота. В контексте данного исследования наибольший интерес представляет роль абсцизовой кислоты в развитии заболеваний растений. Она регулирует закрытие устьиц при детекции патогена, что препятствует колонизации растения [5]. Однако патогены способны преодолевать эту защитную реакцию, продуцируя, к примеру, токсин коронатин [6], блокирующий закрытие устьиц и открывающий ворота инфекции.

Абсцизовая кислота регулирует иммунный ответ растений разнонаправленно: в одних случаях запускает защитные реакции, в других случаях подавляет иммунитет. Похоже, что не существует общего механизма регуляции иммунных реакций посредством абсцизовой кислоты. К примеру, в растениях риса она индуцирует устойчивость к некротрофному патогенному грибу *Cochliobolus miyabeanus*, вызывающему коричневую пятнистость [7], но снижает устойчивость к гемиботрофному грибу *Magnaporthe oryzae* [8]. В растениях арабидопсиса абсцизовая кислота подавляет защитный ответ против биотрофного патогена

Blumeria graminis, вызывающего мучнистую росу [9]. С другой стороны, растения арабидопсиса, дефицитные по абсцизовой кислоте, более устойчивы к некротрофному грибному патогену *Botrytis cinerea* [10].

Абсцизовая кислота подавляет активность фениланинаммонийлиазы, фермента пути биосинтеза фенилпропаноидов, к которым относятся многие антибактериальные вещества, в частности фитоалексины. Помимо этого, фенилпропаноидный путь метаболизма участвует в биосинтезе другого гормона иммунного ответа – салициловой кислоты. Также абсцизовая кислота подавляет образование активных форм кислорода, стимулирует отложение каллозы [11]. Сигнальный путь абсцизовой кислоты находится в постоянном взаимодействии с сигнальными путями салициловой и жасмоновой кислот, этилена и иных гормонов, что дает растениям возможность разнообразить ответ на стрессовые условия среды [11; 12].

Ранее в научно-исследовательской лаборатории трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ было изучено изменение уровней экспрессии генов биосинтеза абсцизовой кислоты в клубнях растений картофеля в ответ на внедрение патогена *Pectobacterium versatile*. Полученные данные свидетельствуют о том, что при внедрении патогена снижается экспрессия генов биосинтеза абсцизовой кислоты и повышается экспрессия гена ее гидроксилазы, что должно приводить к уменьшению количества активной формы гормона рядом с зоной заражения. Такая реакция эффективна при защите от биотрофных патогенов, но в случае заражения некротрофными патогенами она может привести к колонизации растения и его гибели.

Абсцизовая кислота синтезируется в растениях из каротиноидов (рис. 1). Начальные этапы ее синтеза проходят в пластидах. На завершающих этапах 9-*цис*-эпоксикаротиноиддигидрогеназа (NCED3) расщепляет 9-*цис*-неоксантин и 9-*цис*-виолаксантин до ксантоксина [13], который экспортируется в цитоплазму [14]. Далее ксантоксиндегидрогеназа превращает ксантоксин в абсцизовый альдегид [15], который оксидаза абсцизового альдегида метаболизирует до абсцизовой кислоты [16]. В контроле количества активной формы абсцизовой кислоты и регуляции вегетативных и генеративных процессов растения важную роль играет фермент гидроксилаза абсцизовой кислоты [17]. Следует отметить, что гидроксилированная форма абсцизовой кислоты (8'-гидрокси-АБК) биологически неактивна, но она может превращаться в фазиновую кислоту [18], которая участвует в регуляции фотосинтеза и работы устьичного аппарата [19].



Рис. 1. Основные этапы метаболизма абсцизовой кислоты в растении

Fig. 1. Main stages of abscisic acid metabolism in a plant

Считается, что именно 9-*цис*-эпоксикаротиноиддигидрогеназа ограничивает скорость биосинтеза абсцизовой кислоты [20], а из всего семейства белков NCED только NCED3 дифференциально экспрессируется в ответ на стрессовые условия среды [14]. Можно предположить, что сайленсинг гена *NCED3* снизит содержание активной формы абсцизовой кислоты в тканях растений томата и тем самым позволит изучить влияние этого гормона на иммунные реакции растений *Solanum lycopersicum* на заражение патогеном *P. versatile*.

Материалы и методы исследования

Растения *S. lycopersicum* сорта Micro-Tom выращивали при температуре +22 °С и 16-часовом световом дне. Бактерии *Escherichia coli* XL-1 Blue культивировали при температуре +37 °С, а бактерии *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Rif^r, Gen^r, vir⁺) с *vir*-регулоном для доставки конструкций для сайленсинга генов, штамм *P. versatile* JN42 (r⁻, Cm^r (Tn9), Rif^r) дикого типа и штамм *P. versatile* VKE (JN42 *dspE*::pJP5603), мутантный по гену *dspE*, кодирующему основной эффектор системы секреции типа III [21], – при температуре +28 °С.

Конструкция для сайленсинга гена *NCED3* создана путем клонирования по сайтам *Bam*HI и *Sal*I в векторе pTRV2 амплифицированного с помощью праймеров agggatccgctcgcacctgttttcctaaag, aatgtcgactgggtgtcacaatgaacc фрагмента (698 пар нуклеотидов) гена *NCED3* растения *S. bulbocastanum*. Последовательность вставки в полученной плазмиде pTRV2::*NCED3* верифицирована путем секвенирования, а возможность проведения процедуры сайленсинга гена *NCED3* в растениях томата (локус Solyc07g056570.1.1) с использованием плазмиды pTRV2::*NCED3* подтверждена с помощью веб-инструмента *SGN VIGS Tool* (*vigs.solgenomics.net*).

Полученной конструкцией трансформировали клетки штамма *A. tumefaciens* GV3101, которые использовали для индукции сайленсинга, как описано в работе [22]. В качестве контроля вирусного заражения растения трансформировали клетками штамма *A. tumefaciens* GV3101, несущими плазмиду pTRV2::*GFP*. Заражение растений культурами *P. versatile* проводили по истечении 92 дней с момента индукции сайленсинга. Использовали суспензии бактерий в растворе NaCl (0,85 %) с плотностью $1,5 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. По 5 мкл суспензий инокулировали в три последовательно расположенных междоузлия примерно посередине стебля. Учет результатов и отбор растительного материала проводили через 72 ч с момента заражения. Отобранный растительный материал замораживали в азоте и хранили при температуре –80 °С. Выделение РНК проводили по методике, описанной в работе [23]. Препараты РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-Free (*Promega*, США) и синтезировали кДНК с помощью обратной транскриптазы М-MuLV (*New England Biolabs*, Великобритания). Количественную ПЦР проводили с применением амплификатора ДТ-96 (ООО «ДНК-технология», Россия). Для измерения экспрессии использовали по три растения каждой группы. Обработку полученных данных выполняли в программе *Relative Expression Software Tool (REST) 2009* (версия 2.0.13). Выбор в качестве референсных генов *EF1a* (ген фактора элонгации 1a) и *TBP* (ген ТАТА-связывающего белка) осуществлен с помощью алгоритма *geNorm* (версия 3.5).

Оценку уровней экспрессии генов методом количественной ПЦР выполняли с использованием праймеров генов *EF1a* (ttgaggctcttgaccagattaatg, gttcaacacgaccgacagg), *TBP* (ggagccaaaagtgaacaacag, cgtaacttgagaaagcaccgt), *NCED3* (tgctgaaccatggccaaaagt, accatcgtcttctccttctgct), *AAO3* (gctgtcagtgagggtggagataga, caacagctgcattcaagctctgt), *CYP707a1* (ggcaatggggttcaactatgct, gccaccatagaccactgtg), *JAZ* (atcggaaccggaaaaggac, aaggtacttttgcagtcagcct), *NPR5* (gaaagtggcaccctgagga, aaccccgcccagttctttc), *TGA* (gcagctggccgattaggtga, aggatcgccgacatctgttg), *PR1a* (gagggcagccgtgcaa, cacatcttccaccaacacattg), *PR2* (gactaatgtagtgggtacaagatgg, tgacacaactattcctacagatcc), *PR3* (ggatgatgatactgcgctgaag, ttgattgccttcctaacaacaaac), *PR4* (acgtatcattatataaccacagaaca, ccacagaaagcagtcaccagccata), *PR5* (actatcgaggtacgcaacaattg, ccatatacgtgccatcttagtgc), *PR5o* (acaactgtccataaccctgtg, caccatcaaagttgcaattcgtac), *PR6* (agtggaaaatgatggcaatttg, ttaggcataccaggaatagaagc), *PR10* (tgctccaacaccaccatctccctc, tggaccacitcaacaagttc), *NHL* (gccattgccagtgccactaa, ttgcggcgttcactctctg), *WRKY65* (ccagccataatcatctgtgctc, tggggattgagctttgtgt), *U-box* (cctttgaggctcgggtgcag, cgcgtgctatgtgctgaga), *HSR515* (aactctcccttaagtacggac, caatagtcatacactcacga).

Результаты и их обсуждение

Обусловленное сайленсингом гена *NCED3* изменение фенотипа растений *S. lycopersicum*. Экспрессия гена *NCED3* в тканях растений *S. lycopersicum* с сайленсингом снизилась примерно на 50 % от уровня его экспрессии в контрольных растениях. Растения *S. lycopersicum* со сниженной экспрессией гена *NCED3* показали фенотипические отличия от контрольной группы. Используемый в исследовании сорт томата Micro-Tom является детерминантным, растения вырастают довольно низкими (до 10 см), однако растения с сайленсингом гена *NCED3* были еще ниже (примерно 5 см) и выглядели более слабыми по сравнению с контрольными образцами (рис. 2).

Известно, что сверхэкспрессия гена семейства *NCED* у растений томата приводит к повышению гидравлической проводимости корней и снижению гидравлической проводимости устьиц, что повышает эффективность использования воды [24]. При сниженной экспрессии генов *NCED* предполагается противоположный эффект, и фенотипические изменения, выявленные в растениях с сайленсингом гена *NCED3*, объяснимы с точки зрения нарушения водного баланса, хотя визуально увядания не наблюдалось.

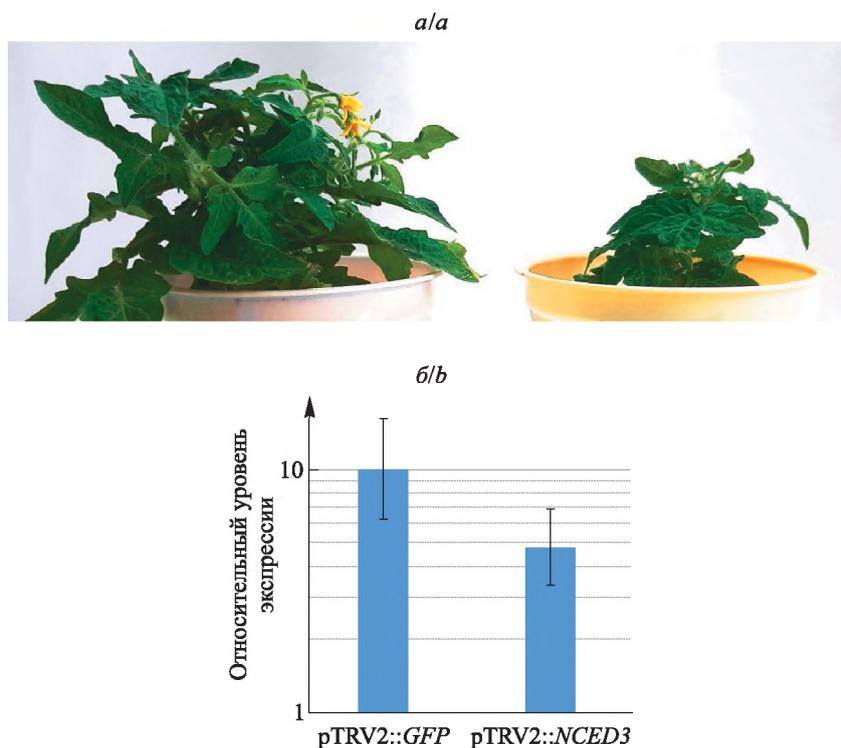


Рис. 2. Типичное растение *S. lycopersicum* сорта Micro-Tom с сайленсингом гена *NCED3* (справа) в сравнении с контрольным растением (слева) на 92-й день после индукции сайленсинга (а). Относительный уровень экспрессии гена *NCED3* в контрольных растениях (pTRV2::GFP) и растениях с сайленсингом (pTRV2::NCED3) (б)

Fig. 2. A typical *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom plant with *NCED3* gene silencing (right) compared to the control plant (left) on the 92nd day after silencing induction (a). Relative level of *NCED3* gene expression in control plants (pTRV2::GFP) and plants with silencing (pTRV2::NCED3) (b)

Для исследования влияния сниженной экспрессии гена *NCED3* на устойчивость растения *S. lycopersicum* к заражению некротрофным бактериальным патогеном использовали бактерии *P. versatile* двух штаммов: JN42 (штамм дикого типа) и VKE (*dspE*-мутант). Мутант по гену *dspE* использовали для оценки роли *NCED3* на фоне отсутствия эффекториндуцируемого компонента иммунной системы растения. Инокуляция стеблей растений томата суспензиями клеток *P. versatile* штамма дикого типа и *dspE*-мутанта вызывала у растений с сайленсингом гена *NCED3* развитие заболевания, выразившегося в повреждении проводящей системы и увядании листьев при введении клеток обоих штаммов патогена, при этом у растений без сайленсинга гена *NCED3* симптомы заболевания не обнаруживались (рис. 3). Заболевание продолжало прогрессировать: наблюдалось отмирание листьев с почернением и последующим усыханием черешка.



Рис. 3. Растения *S. lycopersicum* с сайленсингом гена *NCED3* (три растения слева) в сравнении с контрольными растениями (три растения справа) через 72 ч после заражения патогеном *P. versatile*

Fig. 3. *S. lycopersicum* plants with *NCED3* gene silencing (three plants on the left) compared to the control plants (three plants on the right) 72 h after infection with *P. versatile*

Картина изменений в сигнальных цепях растений *S. lycopersicum* в ответ на внедрение патогена *P. versatile*. При заражении патогеном *P. versatile* меняется экспрессия нескольких генов метаболизма абсцизовой кислоты: незначительно (чуть менее чем в 2 раза) снижается экспрессия гена *NCED3*,

кодирующего 9-*цис*-эпоксикаротиноиддиоксигеназу, однако в отсутствие эффектора DspE экспрессия этого гена восстанавливается до уровня раневого ответа; экспрессия гена *AAO3*, кодирующего оксидазу абсцизового альдегида, в среднем возрастает в 2 и 3 раза при заражении штаммом дикого типа и *dspE*-мутантом соответственно; экспрессия гена *CYP707a1*, кодирующего гидроксилазу абсцизовой кислоты, при внедрении штамма дикого типа не меняется, но в отсутствие эффектора возрастает в 5 раз (рис. 4).

Экспрессия гена *JAZ*, кодирующего негативный регулятор жасмонатзависимых генов, при внедрении патогена обоих штаммов меняется незначительно (см. рис. 4).

Детекция патогена *P. versatile* вызывает колебания экспрессии салицилатзависимых генов в растениях томата: средние значения экспрессии гена регуляторного белка NPR5 возрастают в 3 раза при внедрении штамма дикого типа, однако от образца к образцу данные разнятся, что отражается на доверительном интервале, не позволяющем с уверенностью сказать об изменениях в растении. Кроме того, в 4 раза повышается экспрессия гена защитного белка PR1a, классического маркера салицилатного сигнального пути (см. рис. 4). Для белков этого семейства показано участие в самых разных метаболических процессах, а в регуляторных областях их генов обнаружены 24 типа *цис*-регуляторных элементов в сайтах связывания транскрипционных факторов [25].

Экспрессия генов защитных белков β -1,3-глюканазы PR2, хитиназы PR3 и PR4, тауматинподобного белка PR5, ингибитора протеаз PR6 при внедрении патогена не меняется. Ранее было показано, что дифференциальная экспрессия защитных генов растений томата зависит от плотности бактериальной культуры, и такой эффект может быть обусловлен концентрацией клеток в суспензии, которой заражено растение [26]. Экспрессия гена осмотинподобного белка PR5o при внедрении штамма дикого типа повышается в 3 раза, причем этот эффект зависит от наличия интактного эффектора DspE, в то время как экспрессия гена предполагаемой рибонуклеазы с антимикробной активностью PR10 возрастает в 3 раза при внедрении обоих штаммов.

При заражении патогеном не меняется экспрессия гена транскрипционного фактора WRKY65. Детекция патогена вызывает двукратную индукцию экспрессии гена NDR1/HIN1-подобного белка NHL, компонента E3 убиквитинлигазы U-box и трехкратную индукцию экспрессии гена маркера сверхчувствительности HSR515, причем для последних двух генов указанные изменения DspE-зависимы (см. рис. 4).

Влияние сайленсинга гена *NCED3* на картину экспрессии защитных генов и чувствительность сигнальных компонентов растений *S. lycopersicum* к эффекторному белку DspE. Снижение экспрессии гена *NCED3* не оказывает влияния на экспрессию генов *CYP707a1*, *JAZ*, *PR5o*, но приводит к повышению экспрессии генов *AAO3*, *NPR5*, *PR1a*, *PR3*, *PR5*, *PR10*, *WRKY65* в среднем в 2–4 раза (см. рис. 4).

В условиях сайленсинга гена *NCED3* экспрессия гена *PR2* при заражении штаммом дикого типа возрастает в 6 раз, а при заражении *dspE*-мутантом – лишь в 2 раза. Сниженная экспрессия гена *NCED3* приводит к изменению чувствительности некоторых сигнальных компонентов к эффектору DspE. При раневом ответе экспрессия генов *NHL*, *U-box* и *HSR515* в растениях с сайленсингом не меняется по сравнению с таковой в контроле. Сайленсинг гена *NCED3* приводит к повышению экспрессии гена *NHL* в 3 раза при внедрении штамма дикого типа. В отсутствие эффектора экспрессия данного гена восстанавливается до уровня раневого ответа, в то время как в растениях без сайленсинга гена *NCED3* экспрессия гена *NHL* не зависит от эффектора DspE. Картина экспрессии гена *HSR515* противоположная: при снижении количества транскриптов *NCED3* экспрессия этого гена становится нечувствительной к DspE (не восстанавливается до уровня раневого ответа в случае заражения *dspE*-мутантом) (см. рис. 4). Экспрессия гена *PR4* возрастает в 2 раза при раневом ответе и становится чувствительной к DspE при заражении патогеном (снижается при наличии в среде эффектора и восстанавливается до уровня раневого ответа при введении мутантного штамма) (см. рис. 4).

Таким образом, *NCED3* в растениях *S. lycopersicum* оказывает значительное влияние на экспрессию компонентов сигнальных цепей растения. Для растений *Arabidopsis thaliana* было показано, что ген *NCED3* играет важную роль в накоплении абсцизовой кислоты: изменение уровня его экспрессии приводило к пропорциональному изменению содержания абсцизовой кислоты в растениях [27]. Сайленсинг гена *NCED3*, по всей видимости, снижает накопление абсцизовой кислоты в растениях томата, что, предположительно, активизирует экспрессию компонентов салицилатной сигнализации. Согласно данным литературы продукция абсцизовой кислоты лимитирует количество киназы SID2, регулирующей запуск салицилатной сигнализации [28]. *NCED3* негативно влияет на экспрессию ряда генов защитных белков. Это может быть обусловлено тем, что абсцизовая кислота снижает экспрессию генов с GCC-боксом в промоторе, которыми являются, например, гены *PR1*, *PR2*, *PR3* и *PR5* [29]. Поскольку уровень экспрессии гена *NCED3* биосинтез абсцизовой кислоты снижается, а уровень экспрессии гена *CYP707a1* гидроксилазы, переводящей абсцизовую кислоту в неактивную форму, не меняется, можно предположить, что и количество активной формы абсцизовой кислоты в клетке снижается. Таким образом, *NCED3* является регулятором вегетации растений *S. lycopersicum* и их иммунного ответа (обеспечивает нормальное развитие растений и корректный запуск защитных реакций при внедрении некротрофного патогена).

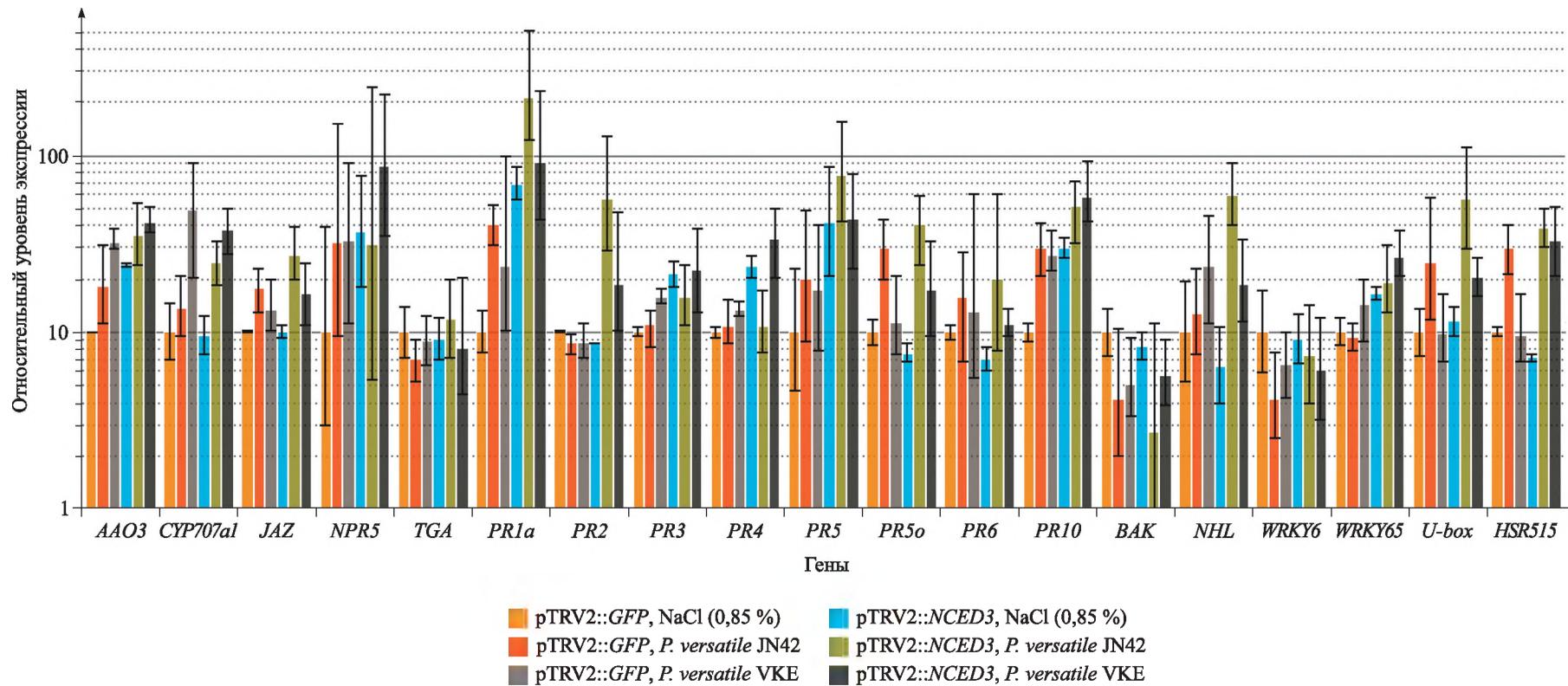


Рис. 4. Изменение экспрессии генов иммунной сигнализации в растениях *S. lycopersicum* сорта Микро-Том с сайленсингом гена *NCED3* (pTRV2::*NCED3*) и контрольных растений (pTRV2::*GFP*) в ответ на заражение патогеном *P. versatilis* (представлены средние значения экспрессии генов с 95 % доверительным интервалом)

Fig. 4. Change in the expression of immune signalling genes in *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom plants with *NCED3* gene silencing (pTRV2::*NCED3*) and control plants (pTRV2::*GFP*) in response to *P. versatilis* infection (mean gene expression values with 95 % confidence intervals are presented)

Заклучение

Показана важная роль NCED3 в регуляции вегетации растений *S. lycopersicum* и их иммунного ответа на заражение патогеном *P. versatile*. Опосредованное NCED3 изменение чувствительности к эффектору DspE требует дополнительного изучения, поскольку фенотипических отличий растений, зараженных *dspE*-мутантом, от растений, зараженных штаммом дикого типа, отмечено не было. Предположительно, ген *NCED3* обеспечивает устойчивость растений томата к пектобактериозу, сдерживая салицилатный сигнальный путь активации иммунного ответа, приводящий к развитию реакции сверхчувствительности. Такой ответ растения выгоден некротрофному патогену, использующему отмершие ткани как среду для роста и толерантному к окислительному взрыву.

Библиографические ссылки / References

1. Charkowski A, Blanco C, Condemine G, Expert D, Franza T, Hayes C, et al. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*. 2012;50:425–449. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-173013.
2. Badalyan OA, Nikolaichik YA. Receptor-like kinases RLK2 and RLK5 of *Nicotiana benthamiana* are involved in regulation of gene expression of key plant immune system components during the contact with *Pectobacterium carotovorum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2014;4:75–80. Russian. EDN: TRPIQT.
3. Marković S, Milić Komić S, Jelušić A, Ilić R, Bagi F, Stanković S, et al. First report of *Pectobacterium versatile* causing blackleg of potato in Serbia. *Plant Disease*. 2022;106(1):312. DOI: 10.1094/PDIS-06-21-1128-PDN.
4. Voronina MV, Lukianova AA, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KA, et al. First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot and black leg of potato in Russia. *Plant Disease*. 2021;105(6):1851. DOI: 10.1094/PDIS-09-20-1864-PDN.
5. Bharath P, Gahir S, Raghavendra AS. Abscisic acid-induced stomatal closure: an important component of plant defense against abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:615114. DOI: 10.3389/fpls.2021.615114.
6. Toum L, Torres PS, Gallego SM, Benavides MP, Vojnov AA, Gudesblat GE. Coronatine inhibits stomatal closure through guard cell-specific inhibition of NADPH oxidase-dependent ROS production. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1851. DOI: 10.3389/fpls.2016.01851.
7. De Vleeschauwer D, Yang Y, Cruz CV, Höfte M. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiology*. 2010;152(4):2036–2052. DOI: 10.1104/pp.109.152702.
8. Yazawa K, Jiang C-J, Kojima M, Sakakibara H, Takatsuji H. Reduction of abscisic acid levels or inhibition of abscisic acid signaling in rice during the early phase of *Magnaporthe oryzae* infection decreases its susceptibility to the fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2012;78:1–7. DOI: 10.1016/j.pmpp.2011.12.003.
9. Jensen MK, Hagedorn PH, de Torres-Zabala M, Grant MR, Rung JH, Collinge DB, et al. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2008;56(6):867–880. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03646.x.
10. L'Haridon F, Besson-Bard A, Binda M, Serrano M, Abou-Mansour E, Balet F, et al. A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLOS Pathogens*. 2011;7(7):e1002148. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002148.
11. Asselbergh B, de Vleeschauwer D, Höfte M. Global switches and fine-tuning – ABA modulates plant pathogen defense. *MPMI*. 2008;21(6):709–719. DOI: 10.1094/MPMI-21-6-0709.
12. Denancé N, Sanchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:155. DOI: 10.3389/fpls.2013.00155.
13. Qin X, Zeevaert JAD. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *PNAS*. 1999;96(26):15354–15361. DOI: 10.1073/pnas.96.26.15354.
14. Xiong L, Zhu J-K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 2003;133(1):29–36. DOI: 10.1104/pp.103.025395.
15. González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, et al. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell*. 2002;14(8):1833–1846. DOI: 10.1105/tpc.002477.
16. Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JAD, et al. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *PNAS*. 2000;97(23):12908–12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197.
17. Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, et al. *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2006;141(1):97–107. DOI: 10.1104/pp.106.079475.
18. Milborrow BV, Carrington NJ, Vaughan GT. The cyclization of 8'-hydroxy abscisic acid to phaseic acid *in vivo*. *Phytochemistry*. 1988;27(3):757–759. DOI: 10.1016/0031-9422(88)84088-3.
19. Sharkey TD, Raschke K. Effects of phaseic acid and dihydrophaseic acid on stomata and the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology*. 1980;65(2):291–297. DOI: 10.1104/pp.65.2.291.
20. Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, et al. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant Journal*. 2000;23(3):363–374. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01606.x.
21. Nikolaichik EA, Ovchinnikova TV, Valentovich LN. Translocation of the DspE protein by phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* into *Nicotiana tabacum* cells and its requirement for inducing a hypersensitivity reaction. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2005;49(5):81–85. Russian.
22. Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*. 2002;31(6):777–786. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x.

23. Eric Carpenter. RNA isolation from plant tissue. Protocol 15: hot acid phenol method for algae. *Protocols.io* [Internet]. 2019 June 27 [cited 2024 March 21]. DOI: 10.17504/protocols.io.4u3gwyn.
24. Thompson AJ, Mulholland BJ, Jackson AC, Mekee JMT, Hilton HW, Symonds RC, et al. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant, Cell and Environment*. 2007;30(1):67–78. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01606.x.
25. Akbudak MA, Yildiz S, Filiz E. Pathogenesis related protein-1 (PR-1) genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): bioinformatics analyses and expression profiles in response to drought stress. *Genomics*. 2020;112(6):4089–4099. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.07.004.
26. Zhan Y, Nikolaichik YA. The dependence of immune response of *Solanum lycopersicum* plants on the number of cells *Pectobacterium carotovorum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2012;3:44–48. Russian. EDN: XQTEWZ.
27. Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2001;27(4):325–333. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01096.x.
28. Alazem M, Lin K-Y, Lin N-S. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of *Bamboo mosaic virus*. *MPMI*. 2014;27(2):177–189. DOI: 10.1094/MPMI-08-13-0216-R.
29. Zhou Jinxin, Zhang Hongbo, Yang Yuhong, Zhang Zhijin, Zhang Haiwen, Hu Xinwen, et al. Abscisic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(3):645–652. DOI: 10.1093/jxb/erm353.

Получена 02.05.2024 / исправлена 30.05.2024 / принята 03.06.2024.
Received 02.05.2024 / revised 30.05.2024 / accepted 03.06.2024.

УДК 582.288.22

НОВЫЕ ДЛЯ БЕЛАРУСИ ВИДЫ ПИКНИДИАЛЬНЫХ СЕПТОРИОПОДОБНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

И. А. ФЕДЮШКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Сообщается о находках 14 новых видов пикнидиальных септориоподобных микромицетов для территории Беларуси (из них 12 видов относятся к роду *Septoria*, 1 вид принадлежит к роду *Rhabdospora*, 1 вид – к роду *Stagonospora*). Приводятся описания и иллюстрации выявленных видов. Вид *Septoria heterochroa* рассматривается как чужеродный для микобиоты Беларуси.

Ключевые слова: грибы; пикнидиальные септориоподобные микромицеты; Гербарий БГУ; MSKU; *Septoria*; *Rhabdospora*; *Stagonospora*; аборигенный компонент микобиоты; чужеродный компонент микобиоты; Беларусь.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» (подпрограмма «Биоразнообразие, биоресурсы, экология», задание 10.2.02 «Проблемы биологических инвазий и паразитарных угроз в природных и антропогенно трансформированных экосистемах», научно-исследовательская работа «Инвазивные фитопатогенные грибы, грибоподобные организмы и беспозвоночные животные на культивируемых и близкородственных дикорастущих растениях: статус в сообществах, распространение, диагностика» (№ гос. регистрации 20211704)). Автор выражает признательность доцентам кафедры ботаники биологического факультета БГУ кандидату биологических наук А. К. Храмцову, кандидату сельскохозяйственных наук В. Д. Поликсеновой и кандидату биологических наук В. Н. Тихомирову за ценные замечания и рекомендации во время подготовки статьи.

Образец цитирования:

Федюшко ИА. Новые для Беларуси виды пикнидиальных септориоподобных микромицетов. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:72–87.
EDN: CPXKYN

For citation:

Fiadziushka IA. New species of pycnidial *Septoria*-like micro-mycetes for Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:72–87. Russian.
EDN: CPXKYN

Автор:

Илья Александрович Федюшко – ассистент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:

Ilya A. Fiadziushka, assistant at the department of botany, faculty of biology.
fiadziushka.ilya@gmail.com

NEW SPECIES OF PYCNIDIAL
SEPTORIA-LIKE MICROMYCETES FOR BELARUSI. A. FIADZIUSHKA^a^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Abstract. The findings of 14 new species of pycnidial *Septoria*-like micromycetes to the territory of Belarus are reported (12 species of which belong to the genus *Septoria*, 1 species belongs to the genus *Rhabdospora*, 1 species – to the genus *Stagonospora*). The identified species are provided descriptions and illustrations. The species *Septoria heterochroa* is considered alien to the mycobiota of Belarus.

Keywords: fungi; pycnidial *Septoria*-like micromycetes; Herbarium of the Belarusian State University; MSKU; *Septoria*; *Rhabdospora*; *Stagonospora*; native component of the mycobiota; alien component of the mycobiota; Belarus.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of the state programme of scientific research «Natural resources and environment» (subprogramme «Biodiversity, bioresources, ecology», assignment 10.2.02 «Problems of biological invasions and parasitic threats in natural and anthropogenically transformed ecosystems», research work «Invasive phytopathogenic fungi, fungi-like organisms and invertebrate animals on cultivated and closely related wild plants: status in communities, distribution, diagnostics» (state registration No. 20211704)). The author expresses gratitude to the associate professors at the department of botany, faculty of biology, Belarusian State University, PhD (biology) A. K. Khramtsov, PhD (agricultural sciences) V. D. Poliksenova and PhD (biology) V. N. Tikhomirov for valuable comments and recommendations during the preparation of the article.

Введение

В широком смысле пикнидиальные септориоподобные микромицеты – это сборная группа микроскопических грибов, которая объединяет анаморфные стадии развития аскомикот, образующих конидиомы пикнидиального типа, а также митоспоры, схожие по строению со сколекоконидиями. Базисом данной морфологической группы микромицетов является род *Septoria* s. l., из которого был выделен ряд новых таксонов родового ранга (*Caryophylloseptoria*, *Nothoseptoria*, *Xenoseptoria* и др.). В рамках этой группы также рассматриваются филогенетически далекие роды из разных классов отдела Ascomycota (*Megaloseptoria*, *Kellermania*, *Stagonospora* и др.) [1–3].

Основываясь на морфологическом подходе к классификации микромицетов, названные грибы относили к отделу Deuteromycota, классу Coelomycetes, порядку Sphaeropsidales, семейству Sphaeropsidaceae в системах Саккардо, Поттебни [2]. Б. Ч. Саттон [3] включал их в класс Blastodeuteromycetes, а В. А. Мельник [4] – в подпорядок Blastosphaeropsidineae класса Coelomycetes, подчеркивая тем самым у вышеуказанных грибов бластический способ конидиогенеза. В филогенетической системе их рассматривают в рамках телеоморфных грибов отдела Ascomycota [1; 5].

Большинство представителей пикнидиальных септориоподобных микромицетов являются фитопатогенными грибами, которые поражают дикорастущие и культивируемые виды, периодически приводят к эпифитотиям, потерям урожая или декоративности растений [1–10]. Некоторые из них используются как продуценты ценных биологически активных веществ, применяемых для контроля сорных растений в агрофитоценозах [11]. Кроме того, вторичные метаболиты ряда видов пикнидиальных септориоподобных микромицетов используются для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов [12].

При обработке материалов, депонированных в Гербарии БГУ (MSKU), было обнаружено 14 новых для Беларуси видов пикнидиальных септориоподобных микромицетов.

Материалы и методы исследования

В ходе проведенного исследования были обработаны собственные сборы, а также сборы других коллекторов (И. С. Гирилович, А. К. Храмцов, О. В. Савина, М. А. Романович, М. Н. Нарейко), хранящиеся в фонде Гербария БГУ.

Сбор материала проводился маршрутным методом исследований [13] с апреля по октябрь 2023 г. Идентификация грибов и их растений-хозяев, а также изучение морфометрических показателей выполнялись методами световой микроскопии с использованием бинокулярных микроскопов Stemi-2000 (*Carl Zeiss*, Германия), «Микромед-2» (модель 2-20 inf.) (компания «Микромед», Россия), соответствующих определителей и монографий [1–10; 14; 15]. Для усиления визуализации прозрачных объектов при

микроскопировании использовался 1 % водный раствор метиленового синего [16]. Валидность и синонимика латинских названий таксонов микромицетов и растений, а также их систематическое положение приведены в соответствии с международными глобальными базами данных Plants of the World Online¹, APG IV [17] (для растений), MycoBank² (для микромицетов).

Для изучения изменчивости морфометрических характеристик конидий использованы следующие критерии описательной статистики: $(\min-Q_1-Q_3(-\max))$, M_o , где \min – минимальное значение признака; Q_1-Q_3 – межквартильный размах; \max – максимальное значение признака; M_o – мода. Объемы выборок составляли не менее 30 шт. Для диаметра пикнид указаны только минимальное и максимальное значения признака.

Для статистического анализа данных были использованы возможности языка программирования R [18; 19]. Перевод микрофотографий в векторные изображения, а также работа с графическим материалом осуществлялись с помощью бесплатного программного обеспечения *Inkscape*³.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенного исследования выявлено 14 видов пикнидиальных септориоподобных микромицетов, новых для территории Беларуси. Они обнаружены на 16 видах из 9 семейств цветковых растений. Ниже приводятся оригинальные описания выявленных грибов, сопровождающиеся иллюстрациями конидий и поражений растений. Кроме того, в них представлены сведения о соотношении длины и ширины конидий, что является дополнительным критерием при диагностике видов микромицетов [1]. Уточнено количество поперечных перегородок конидий, которое служит важным диагностическим признаком для некоторых видов. Более детально очерчены границы изменчивости размеров конидий. Отмеченные особенности видовых признаков указаны в примечаниях.

Rhabdospora viciae Vasyag., in Z. M. Byzova et al., Flora sporovykh rastenii Kazakhstana [Cryptogamic flora of Kazakhstan], t. 5, Nesovershennyye griby – Fungi imperfecti (Deuteromycetes), kn. 3, Sphaeropsidnye – Sphaeropsidales (Alma-Ata): 377 (1970) (см. вклейку, рис. 1).

Анаморфа: *R. viciae* Vasyag.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятен нет. Пикниды полупогруженные, диаметром 70–140 мкм, располагаются рассеянно. Оболочка пикниды тонкая, угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, цилиндрические, слегка изогнутые, на вершинах округлые или заостренные, размером (15,0–)26,5–33,5(–40,0) × 2,0–3,0 мкм (по моде 29,0 × 2,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (6,7–)12,8–16,8(–20,0) (по моде 14,5). Содержат множество мелких липидных капель. Количество перегородок (0–)1–2(–3), чаще 2 шт.

Распространение в Беларуси: на сухих листьях и стеблях *Vicia tetrasperma* (L.) Schreb. (Fabaceae), Минская область, Несвижский район, д. Саска Липка (MSKU-F 9751, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 23.04.2022).

Общее распространение: Азия.

Примечание. Обнаружение *R. viciae* можно ожидать и на других видах растений рода *Vicia* (Fabaceae). В протологе для микромицета отмечено наличие на стеблях округлых, продолговатых, серо-черных пятен, обусловленных большим количеством пикнид [7]. На исследуемом же образце пятна не выявлены, так как пикниды рассеяны по тканям отмирающих стеблей и листьев.

Septoria aegopodina Sacc., Michelia 1(2): 185 (1878) (см. вклейку, рис. 2).

Анаморфа: *S. aegopodina* Sacc.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна очень мелкие, угловатые, коричневые, но со временем белеют, могут быть с красноватой каймой. Пикниды полупогруженные, диаметром 100–150 мкм, рассеяны по пятну с обеих сторон листовой пластинки. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, нитевидные, местами могут быть изогнутыми, у вершин утончаются, имеют размер (12,0–)17,5–34,3(–40,0) × (1,0–)1,5–2,0 мкм (по моде 25,0 × 1,5 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (6,0–)9,9–20,9(–25,0) (по моде 6,0). Количество перегородок 0–3 шт., но чаще они отсутствуют.

¹Plants of the World Online [Electronic resource] / Royal Botanic Gardens, Kew. URL: <https://powo.science.kew.org> (date of access: 15.02.2024).

²MycoBank database: fungal databases, nomenclature and species banks [Electronic resource]. URL: <https://www.mycobank.org> (date of access: 15.02.2024).

³Inkscape. Рисуи свободно [Электронный ресурс]. URL: <https://www.inkscape.org/ru/> (дата обращения: 15.02.2024).

Распространение в Беларуси: на листьях *Aegopodium podagraria* L. (Ариáceе), г. Минск (MSKU-F 11307, коллектор М. А. Романович, дата сбора 25.08.2011); на *Pimpinella* sp. (Ариáceе), г. Минск (MSKU-F 17698, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 16.09.2023).

Общее распространение: Европа.

Примечание. Обнаружение *S. aegopodina* можно ожидать и на культивируемых декоративных формах *A. podagraria*, а также на дикорастущих видах рода *Pimpinella* (Ариáceе). Кроме вышеназванного микромицета, растения родов *Aegopodium* и *Pimpinella* могут поражаться видом *S. aegopodii* Desm., который отличается более крупными цилиндрическими конидиями размером $(30,0-55,0-95,0(-115,0) \times 3,5-4,0$ мкм с перегородками в количестве $(0-1-2(-3)$ шт. [5].

Septoria aromatica Kabát & Bubák, Österr. bot. Z. 54(1): 27 (1904) (см. вклейку, рис. 3).

Анаморфа: *S. aromatica* Kabát & Bubák.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Изначально пятен нет, но со временем могут появиться желтые, желто-зеленые или коричневые некрозы. Пикниды полупогруженные, диаметром 160–250 мкм, хаотично рассеяны с обеих сторон листовой пластинки, могут срастаться между собой (в этом случае их диаметр может достигать до 400 мкм). Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии I-образные, реже C-образные, цилиндрические, слегка изогнутые, с закругленными концами, реже слегка заостренные у вершины, размером $(16,0-55,0-70,0(-82,0) \times (2,0-3,0(-4,0)$ мкм (по моде $60,0 \times 3,0$ мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет $(5,3-17,8-23,3(-35,0)$ (по моде 20,0). Выходят из пикнид белыми тяжами или белыми корочками, которые со временем желтеют. Содержат множество липидных капель. Количество перегородок 0–1 шт., чаще встречаются конидии с 1 перегородкой, которая может просматриваться слабо, но при окрашивании становится четко различимой, молодые конидии не имеют перегородки.

Распространение в Беларуси: на листьях *Chaerophyllum* sp. (Ариáceе), г. Минск (MSKU-F 9596, MSKU-F 9628/2, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 12.09.2023); на листьях *C. aromaticum* L., г. Витебск (MSKU-F 7125, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 16.09.1997), Гродненская область, Мостовский район, г. Мосты (MSKU-F 7123, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 24.08.1996), Минская область, Минский район, окрестности д. Цнянки (MSKU-F 7124, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 01.06.1986) и окрестности д. Хатежино (MSKU-F 7076, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 23.05.1988).

Общее распространение: Европа.

Примечание. Обнаружение *S. aromatica* можно ожидать и на других видах растений рода *Chaerophyllum* (Ариáceе), которые, кроме вышеназванного микромицета, могут поражаться следующими видами: *S. chaerophylli-aromatici* Kabát & Bubák (конидии размером $(14,0-28,3-40,0(-50,0) \times 1,0-1,5(-2,0)$ мкм со слабовидными перегородками в количестве 0–3(–4) шт.) (данные автора); *S. chaerophylli* Bres. (конидии размером $10,0-14,0 \times 2,0-3,0$ мкм с 1–3 перегородками) [10]; *S. weissii* Allesch. (конидии размером $35,0-85,0 \times 2,0-3,0$ мкм со множеством перегородок) [10]; *S. anthrisci* Pass. & Brunaud (конидии размером $(18,0-25,0-59,0(-65,0) \times 1,0-2,0$ мкм со слабовидными перегородками в количестве $(0-1-3(-4)$ шт.) [5; 10].

Septoria cerastii Roberge ex Desm., Ann. Sci. Nat. Sér. 3, Bot. 11: 347 (1849) (см. вклейку, рис. 4).

Анаморфа: *S. cerastii* Roberge ex Desm.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна без каймы, бледно-желтые, со временем сереют, коричневеют, на ранних этапах развития болезни могут отсутствовать (особенно на стеблях). Пикниды полупогруженные, диаметром 70–120 мкм, густо рассеяны, располагаются в основном на верхней стороне листовой пластинки, единично могут обнаруживаться на нижней стороне листа. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии I-образные, нитевидные, слегка извилистые, реже почти прямые, с заостренными концами, размером $(20,0-30,0-45,0(-52,0) \times 1,0-1,5(-2,0)$ мкм (по моде $30,0 \times 1,0$ мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет $(17,5-25,0-40,0(-50,0)$ (по моде 30,0). Выходят из пикнид белыми тяжами. Перегородки в количестве 0–3(–5) шт. ясно просматриваются, но чаще отсутствуют.

Распространение в Беларуси: на листьях, чашелистиках и стеблях *Cerastium holosteoides* Fr. (Сагуорфиллаáceе), Минская область, Воложинский район, окрестности геостанции «Западная Березина» (MSKU-F 7121, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 18.07.2003).

Общее распространение: Европа, Азия, Северная Америка.

Примечание. Обнаружение *S. cerastii* можно ожидать и на других видах растений родов *Cerastium* и *Stellaria* (Сагуорфиллаáceе). Кроме вышеназванного микромицета, растения рода *Cerastium* могут поражаться видом *S. caryophylli* Scalia (конидии размером $27,0-35,0 \times 3,0-3,5$ мкм с 1 перегородкой), вызывающим охристые пятна с коричневой каймой [10].

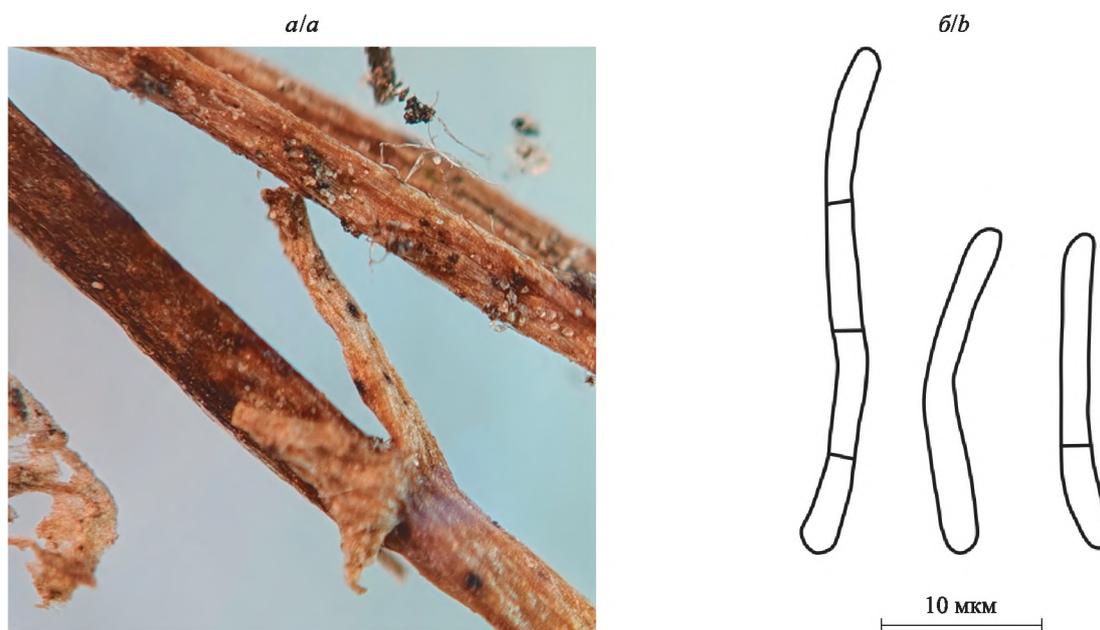


Рис. 1. *R. viciae* (MSKU-F 9751):
a – фрагменты поврежденных стеблей и листа *V. tetrasperma*; *б* – конидии

Fig. 1. *R. viciae* (MSKU-F 9751):
a – fragments of damaged stems and leaf of *V. tetrasperma*; *b* – conidia



Рис. 2. *S. aegopodina* (MSKU-F 11307):
a – пораженный участок листа *A. podagraria*; *б* – конидии

Fig. 2. *S. aegopodina* (MSKU-F 11307):
a – affected area of the *A. podagraria* leaf; *b* – conidia

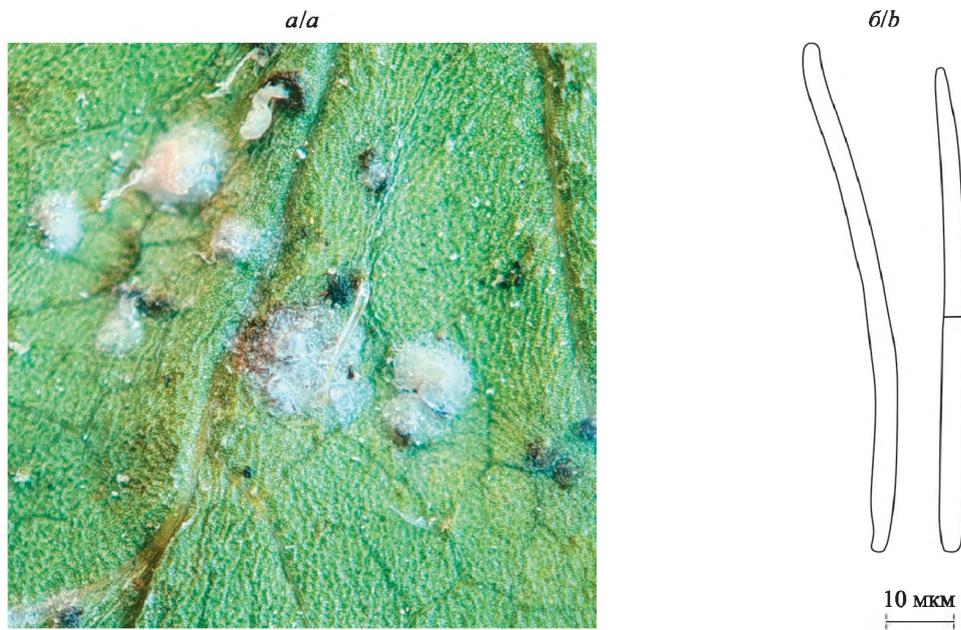


Рис. 3. S. aromatica (MSKU-F 9596):
a – пораженный участок листа *Chaerophyllum* sp.; *б* – конидии

Fig. 3. S. aromatica (MSKU-F 9596):
a – affected area of a *Chaerophyllum* sp. leaf; *b* – conidia

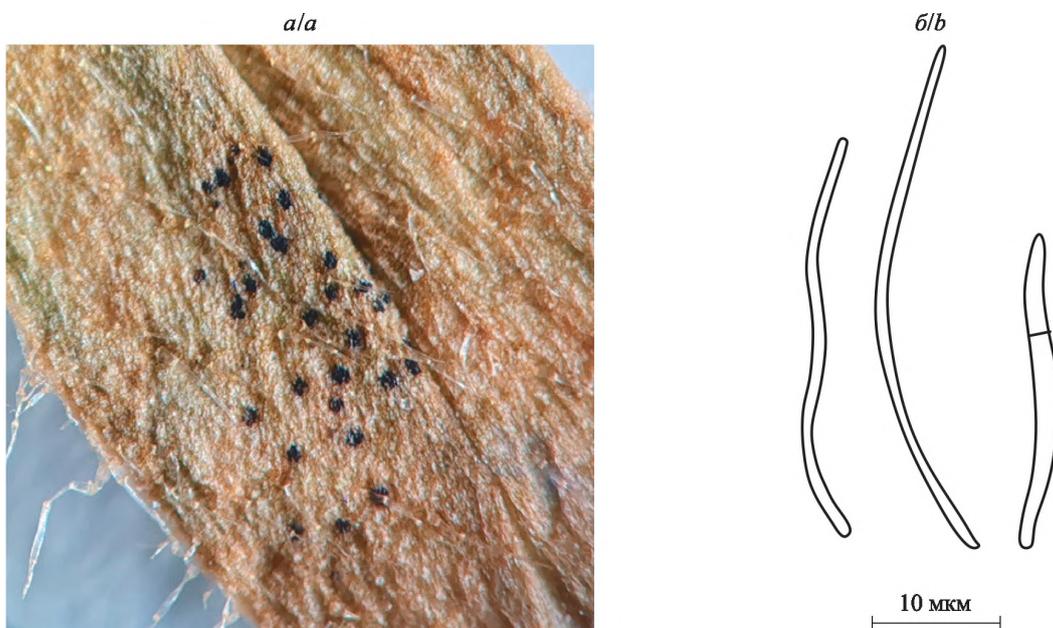


Рис. 4. S. cerastii (MSKU-F 7121):
a – пораженный участок листа *C. holsteoides*; *б* – конидии

Fig. 4. S. cerastii (MSKU-F 7121):
a – affected area of the *C. holsteoides* leaf; *b* – conidia

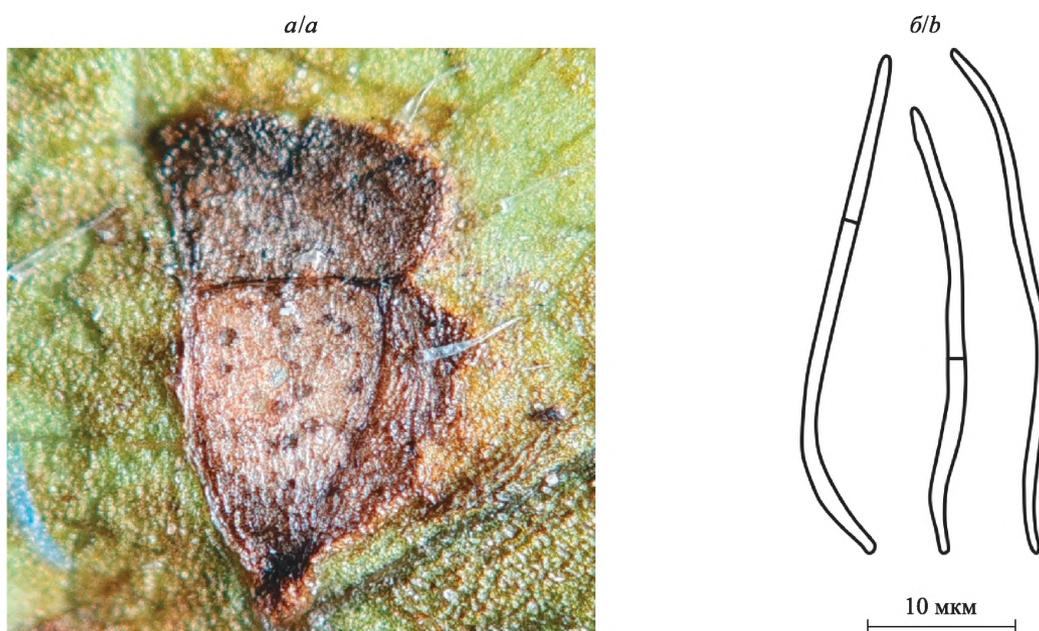


Рис. 5. *S. chaerophylli-aromatici* (MSKU-F 9628/1):
a – пораженный участок листа *Chaerophyllum* sp.; *б* – конидии
Fig. 5. *S. chaerophylli-aromatici* (MSKU-F 9628/1):
a – affected area of a *Chaerophyllum* sp. leaf; *b* – conidia

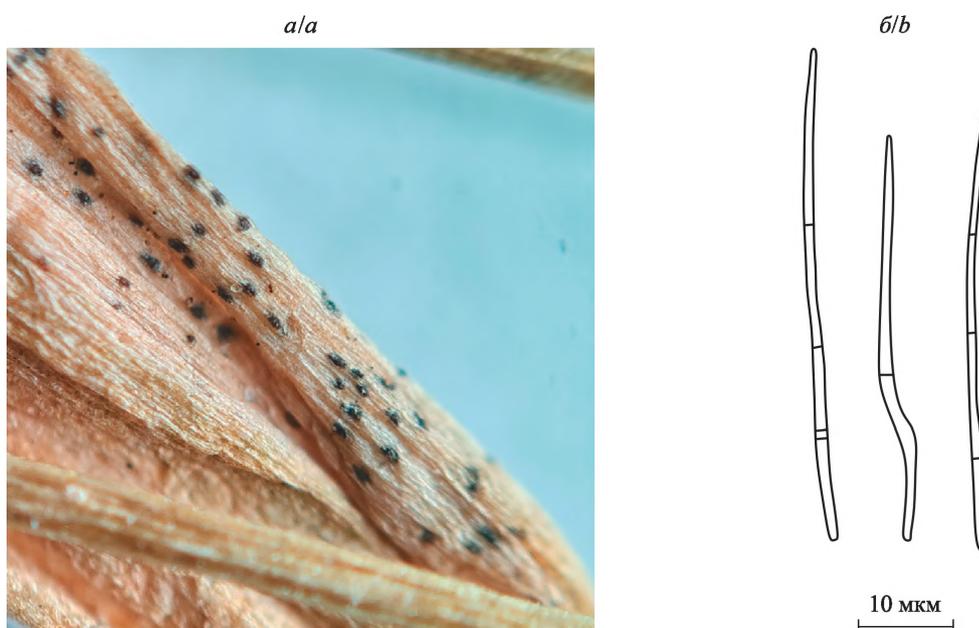


Рис. 6. *S. commutata* (MSKU-F 7116):
a – пораженный участок листа *G. lutea*; *б* – конидии
Fig. 6. *S. commutata* (MSKU-F 7116):
a – affected area of the *G. lutea* leaf; *b* – conidia

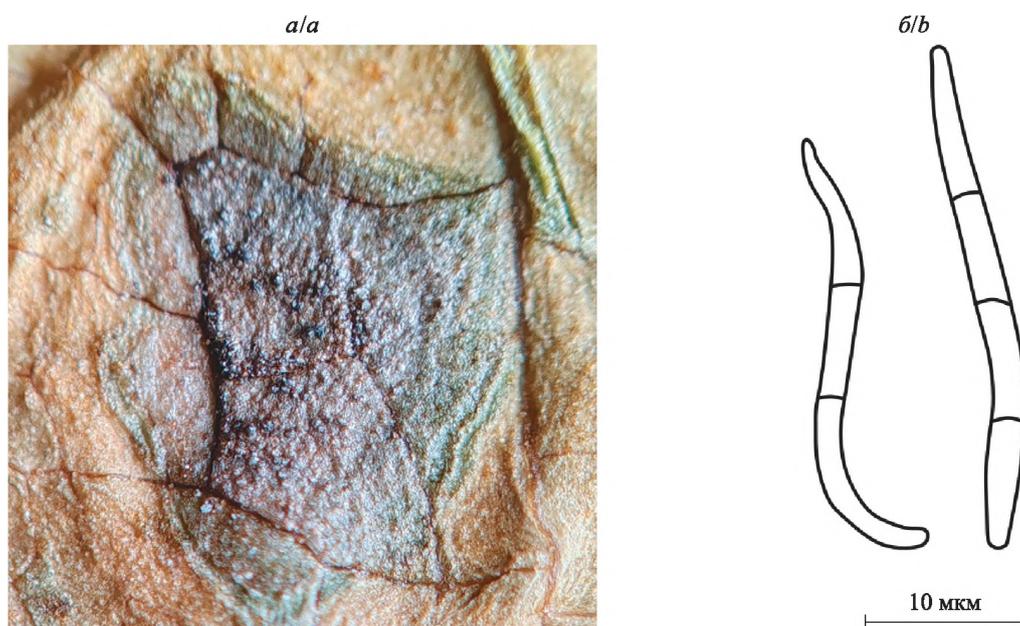


Рис. 7. S. geranii (MSKU-F 11271/1);
a – пораженный участок листа *P. zonale*; *б* – конидии
Fig. 7. S. geranii (MSKU-F 11271/1);
a – affected area of the *P. zonale* leaf; *b* – conidia



Рис. 8. S. heterochroa (MSKU-F 7112);
a – пораженный участок листа *M. pusilla*; *б* – конидии
Fig. 8. S. heterochroa (MSKU-F 7112);
a – affected area of the *M. pusilla* leaf; *b* – conidia

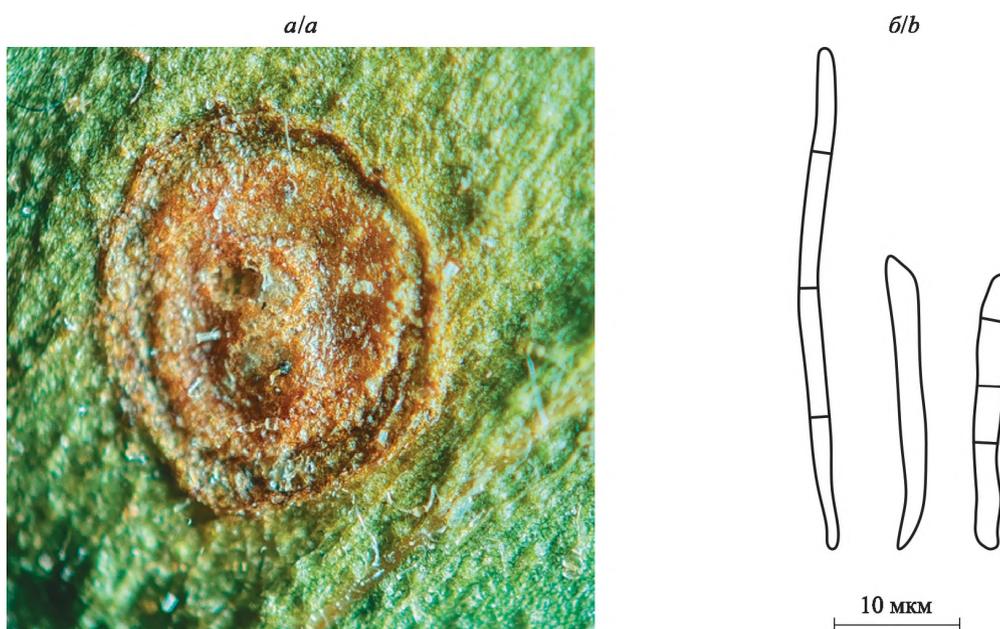


Рис. 9. S. melandryi-albi (MSKU-F 17738):
a – пораженный участок листа *S. latifolia* (syn. *M. album*); *б* – конидии
Fig. 9. S. melandryi-albi (MSKU-F 17738):
a – affected area of the leaf of *S. latifolia* (syn. *M. album*); *b* – conidia



Рис. 10. S. plantaginis-majoris (MSKU-F 17728/1):
a – пораженный участок листа *P. major*; *б* – конидии
Fig. 10. S. plantaginis-majoris (MSKU-F 17728/1):
a – affected area of the *P. major* leaf; *b* – conidia



Рис. 11. *S. posoniensis* (MSKU-F 9833/1):
a – пораженный участок листа *C. alternifolium*; *б* – конидии

Fig. 11. *S. posoniensis* (MSKU-F 9833/1):
a – affected area of the *C. alternifolium* leaf; *b* – conidia

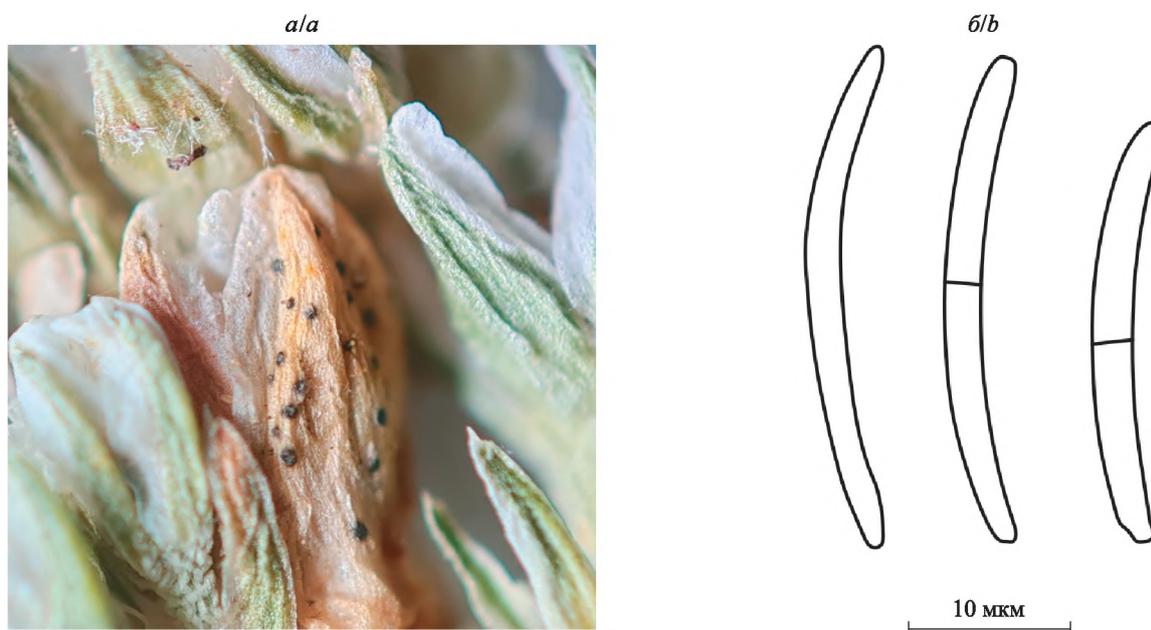


Рис. 12. *S. scleranthi* (MSKU-F 8911):
a – пораженные чашелистики *S. perennis*; *б* – конидии

Fig. 12. *S. scleranthi* (MSKU-F 8911):
a – affected sepals of *S. perennis*; *b* – conidia



Рис. 13. S. stellariae (MSKU-F 9526):
a – пораженный участок листа *S. graminea*; *б* – конидии
Fig. 13. S. stellariae (MSKU-F 9526):
a – affected area of the *S. graminea* leaf; *b* – conidia

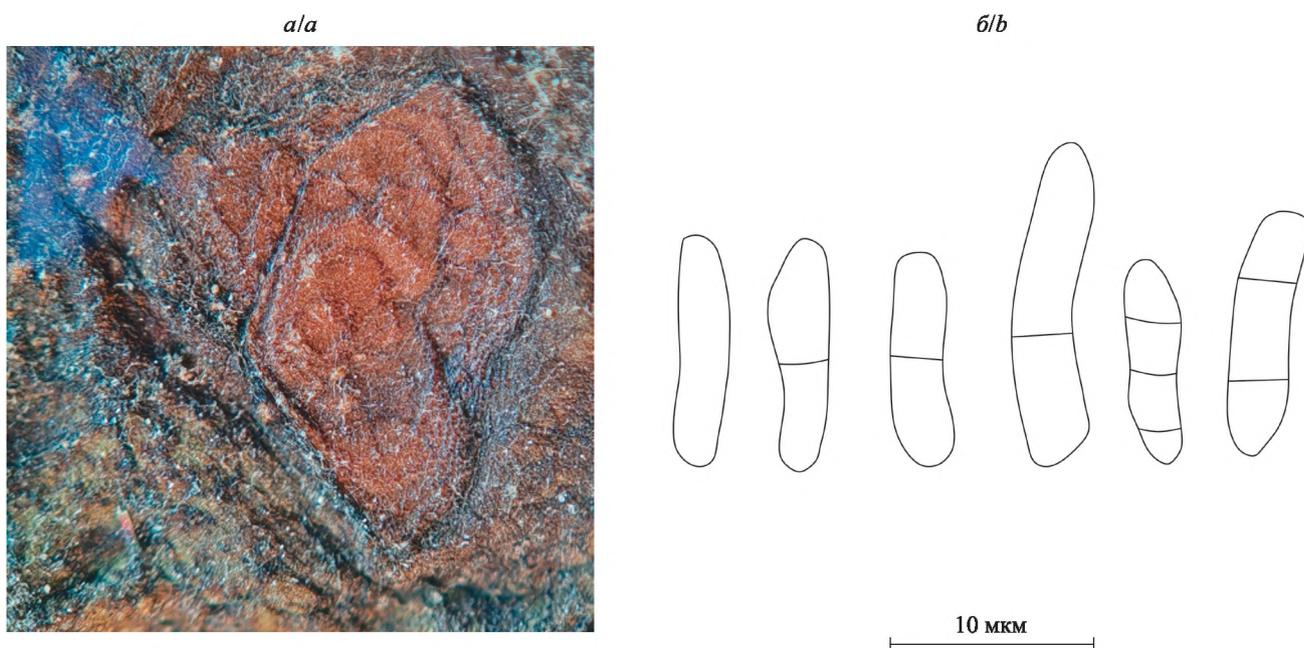


Рис. 14. S. convolvuli (MSKU-F 8617/2):
a – пораженный участок листа *C. sepium*; *б* – конидии
Fig. 14. S. convolvuli (MSKU-F 8617/2):
a – affected area of the *C. sepium* leaf; *b* – conidia

Septoria chaerophylli-aromatici Kabát & Bubák, Hedwigia 43: 419 (1904) (см. вклейку, рис. 5).

Анаморфа: *S. chaerophylli-aromatici* Kabát & Bubák.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна мелкие, угловатые или округлые, сначала грязно-зеленые, позже темно-бурые с желтоватым ореолом, иногда встречаются пятна с более светлым центром. Пикниды полупогруженные, диаметром 50–100 мкм, скучены в центре пятна, располагаются в основном на верхней стороне листовой пластинки, единично могут обнаруживаться на нижней стороне листа. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*- и *C*-образные, нитевидные, слегка извилистые, реже почти прямые, на концах заостренные, размером (14,0–)28,3–40,0(–50,0) × 1,0–1,5(–2,0) мкм (по моде 35,0 × 1,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (14,0–)19,8–30,0(–49,0) (по моде 30,0). Могут содержать мелкие липидные капли. Перегородки в количестве 0–3(–4) шт. слабо видны без окраски, но чаще они отсутствуют.

Распространение в Беларуси: на листьях *Chaerophyllum* sp. (Apiaceae), г. Минск (MSKU-F 9628/1, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 12.09.2023).

Общее распространение: Европа.

Примечание. См. примечание к *S. aromatica*.

Septoria commutata Bubák, Hedwigia 57: 333 (1916) (см. вклейку, рис. 6).

Анаморфа: *S. commutata* Bubák.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна вытянутые, без каймы, желтоватые, со временем могут становиться коричневыми или серыми. Пикниды полупогруженные, диаметром 70–180 мкм, рассеяны или густо скучены с обеих сторон листовой пластинки. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, нитевидные, слегка извилистые, реже почти прямые, у основания суженные, закругленные или заостренные, на вершине заостренные, размером (13,0–)37,0–46,0(–52,0) × 1,0–1,5(–1,7) мкм (по моде 40,0 × 1,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (13,0–)27,8–40,0(–52,0) (по моде 33,3). Количество перегородок (0–)1–3(–5), чаще 3 шт., при окрашивании они становятся более четко различимыми.

Распространение в Беларуси: на листьях *Gagea minima* (L.) Ker Gawl. (Liliaceae s. str.), Гомельская область, Жлобинский район, окрестности д. Долины (MSKU-F 7117, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 02.05.1993); на листьях *G. lutea* (L.) Ker Gawl. (Liliaceae s. str.), Гомельская область, Жлобинский район, окрестности д. Долины (MSKU-F 7116, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 02.05.1993).

Общее распространение: Европа.

Примечание. Обнаружение *S. commutata* можно ожидать и на иных растениях рода *Gagea* (Liliaceae s. str.), причем как на дикорастущих, так и на культивируемых. Другие виды септорий на гусятнике не отмечены. Данный вид является узкоспециализированным патогеном на растениях рода *Gagea* [10].

Septoria geranii Roberge ex Desm., Ann. Sci. Nat. Sér. 3, Bot. 20: 93 (1853) (см. вклейку, рис. 7).

Анаморфа: *S. geranii* Roberge ex Desm.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна неопределенной формы, серо-коричневые или оливково-коричневые, с широкой пурпурной каймой, которая со временем становится желтовато-зеленой с синим оттенком. Пикниды полупогруженные, диаметром 90–120 мкм, скучены или рассеяны по пятну, располагаются преимущественно на верхней стороне листовой пластинки, также имеются на нижней стороне листа, но не так многочисленны. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, цилиндрические, слабоизогнутые, реже почти прямые, с закругленными или суженными относительно тела конидии концами, размером (15,0–)25,6–36,0(–50,0) × 2,0–2,5 мкм (по моде 35,0 × 2,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (7,5–)12,7–18,0(–25,0) (по моде 10,0). Выходят из пикнид золотистыми тяжами. Перегородки ясно прослеживаются, их количество составляет (1–)3–4(–5), чаще 3 шт.

Распространение в Беларуси: на листьях *Pelargonium zonale* (L.) L'Hér. (Geraniaceae), Минская область, Слуцкий район, г. Слуцк (MSKU-F 11271/1, коллектор О. В. Савина, дата сбора 01.09.2010).

Общее распространение: Европа, Азия.

Примечание. Обнаружение *S. geranii* можно ожидать на дикорастущих и культивируемых видах рода *Geranium* (Geraniaceae). Кроме вышеназванного микромицета, на них и на культивируемых в летний период в открытом грунте в Беларуси растениях *P. zonale*, вероятно, стоит ожидать появление вида *S. expansa* Niessl (конидии в массе красноватые, размером 31,0–86,0 × 1,0–2,0 мкм, с неявными перегородками), вызывающего пятна медвяно- или охряно-желтого цвета без каймы [10].

Septoria heterochroa Roberge ex Desm., Ann. Sci. Nat. Sér. 3, Bot. 8: 21 (1847) (см. вклейку, рис. 8).

Анаморфа: *S. heterochroa* Roberge ex Desm.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна неправильной формы, угловатые или кругловатые, темно-зеленые, коричневатые со светлым центром или буро-серые, могут быть окаймлены валиком мертвой ткани листа. Пикниды полупогруженные, диаметром 60–100 мкм, скучены в центре пятен или рассеяны по всему пятну на верхней стороне листовой пластинки, реже единично могут обнаруживаться на нижней стороне листа. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, нитевидные, реже извилистые, слегка изогнутые, на концах слабо заостренные, размером (20,0–)25,0–37,5(–40,0) × (1,0–)1,5–2,0 мкм (по моде 35,0 × 2,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (10,0–)13,4–23,3(–35,0) (по моде 12,5). Иногда видны липидные капли. Количество перегородок 0–1(–2) шт., без окраски они слабо различимы, но чаще отсутствуют.

Распространение в Беларуси: на листьях *Malva pusilla* Sm. (Malvaceae), Минская область, Минский район, окрестности п. Семково (MSKU-F 7112, коллектор И. С. Гирилович, дата сбора 08.08.2004).

Общее распространение: Европа, Северная Америка.

Примечание. Обнаружение *S. heterochroa* можно ожидать на дикорастущих и культивируемых растениях рода *Malva* (Malvaceae). Данный вид может рассматриваться как чужеродный компонент микобиоты Беларуси, проникший на территорию республики вместе с представителями рода *Malva*, которые являются исключительно адвентивными для флоры Беларуси [20–22]. Факт выявления инвайдера требует мониторинга за его распространением на территории страны, расширением круга хозяев, а также определения статуса в фитоценозах.

Septoria melandryi-albi Bäumler, Verhandlungen des Vereins für Naturkunde zu Presburg 14: 47 (1902) (см. вклейку, рис. 9).

Анаморфа: *S. melandryi-albi* Bäumler.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна мелкие, светло-охряные, в центре бледнеют, по периферии имеют темную кайму. Пикниды полупогруженные, диаметром 100–200 мкм, располагаются в центре пятна на верхней стороне листовой пластинки, на очень мелких пятнах находится по 1 пикниде. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, цилиндрические, с закругленными концами, могут быть слегка изогнутыми и содержать липидные капли, имеют размер (15,0–)25,0–40,0(–50,0) × (2,0–)3,0(–4,0) мкм (по моде 40,0 × 3,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (5,0–)7,4–13,3(–18,4) (по моде 13,3). Перегородки четко прослеживаются, их количество составляет (0–)1–3, чаще 3 шт.

Распространение в Беларуси: на листьях и стеблях *Silene latifolia* Poir. (*S. latifolia* subsp. *alba* (Mill.) Greuter & Burdet (syn. *Melandrium album* (Mill.) Garcke)) (Caryophyllaceae), Минская область, Несвижский район, г. Несвиж (MSKU-F 17738, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 14.08.2023).

Общее распространение: Европа, Азия.

Примечание. Обнаружение вида *S. melandryi-albi*, поражающего не только листья, но и стебли, можно ожидать на дикорастущих растениях рода *Silene* (syn. *Melandrium*) (Caryophyllaceae). Кроме вышеупомянутого микромицета, на *S. latifolia* возможно выявление следующих микромицетов: *Caryophylloseptoria lychnidis* (Desm.) Verkley, Quaedvl. & Crous (syn. *S. lychnidis* Desm.) (конидии размером (22,0–)39,0–75,0(–85,0) × 2,0–3,0 мкм с перегородками в количестве (0–)3–5(–7) шт.); *C. silenes* (Westend.) Verkley, Quaedvl. & Crous (syn. *S. silenes* Westend.) (конидии размером 21,0–37,0 × 2,0–3,5(–4,0) мкм с перегородками в количестве (0–)1(–4) шт.) [5]; *S. dimera* Sacc. (конидии размером 25,0–40,0 × 3,0–4,0 мкм с 3 перегородками); *S. doehlii* Syd. (конидии размером 36,0–64,0 × 3,0–3,5 мкм без перегородок); *S. silenes-nutantis* C. Massal. ex Sacc. (конидии размером 50,0–70,0 × 1,5–2,0 мкм без перегородок) [10].

Septoria plantaginis-majoris (Sacc.) Nannf., Fungi Exsicc. Suec. Fasc. 39–40: no. 1915 (1950) (см. вклейку, рис. 10).

Анаморфа: *S. plantaginis-majoris* (Sacc.) Nannf.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна угловатые, иногда складчатые, серо-коричневые, зеленоватые или бледно-серые со слабо выраженной темной каймой либо без нее. Пикниды полупогруженные, диаметром 50–110 мкм, рассеяны по пятну на верхней стороне листовой пластинки. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии *I*-образные, нитевидные, с закругленными концами, могут быть слегка изогнутыми, имеют размер (20,0–)25,0–28,0(–45,0) × 1,0–1,5 мкм (по моде 25,0 × 1,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (14,0–)22,0–28,0(–45,0) (по моде 25,0). Чаще конидии одноклеточные, реже имеют 1 перегородку.

Распространение в Беларуси: на листьях *Plantago major* L. (Plantaginaceae), Минская область, Несвижский район, окрестности железнодорожной станции «Городея» (MSKU-F 17728/1, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 08.08.2023).

Общее распространение: Европа, Азия.

Примечание. Обнаружение *S. plantaginis-majoris* можно ожидать и на других видах рода *Plantago* (Plantaginaceae). Особо пристальное внимание нужно уделить фармакопейному виду *P. major*, который используется для производства ряда лекарственных препаратов на растительной основе. Кроме вышеназванного микромицета, растения рода *Plantago* могут поражаться грибом *S. inconspicua* Berk. & M. A. Curtis (конидии размером 15,0–33,0 × 1,5 мкм без перегородок), вызывающим на листьях белые пятна, и грибом *S. plantaginis* (Ces.) Sacc. (конидии размером 30,0–70,0 × 2,5–3,0 мкм с 2–3 перегородками), вызывающим на листьях свинцово-серые пятна, покрытые беловатой засохшей корочкой [10].

Septoria posoniensis Bäumler, Hedwigia 24: 75 (1885) (см. вклейку, рис. 11).

Анаморфа: *S. posoniensis* Bäumler.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна округлые или неправильной формы, серо-зеленые с темным ободком либо полностью коричневые. Пикниды погруженные, диаметром 70–120 мкм, густо рассеяны или сгущены на верхней стороне листовой пластинки. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии I-образные, нитевидные, очень тонкие, местами могут перегибаться, у основания округлые (крупные конидии) или заостренные (мелкие конидии), у вершины заостренные, размером (16,0–)31,0–42,0(–50,0) × (1,0–)1,2–1,5 мкм (по моде 31,0 × 1,2 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (10,7–)22,5–36,0(–50,0) (по моде 20,7). Могут содержать мелкие липидные капли. Количество перегородок (0–)1–3, чаще 3 шт.; без окраски они неразличимы.

Распространение в Беларуси: на листьях и чашелистиках *Chrysosplenium alternifolium* L. (Saxifragaceae), Минская область, Несвижский район, окрестности г. Несвижа (MSKU-F 9833/1, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 06.05.2019).

Общее распространение: Европа, Азия.

Примечание. Данный вид является узкоспециализированным патогеном на растениях рода *Chrysosplenium* (Saxifragaceae) [8; 10].

Septoria scleranthi Desm., Bull. Soc. Bot. France 4: 861 (1857) (см. вклейку, рис. 12).

Анаморфа: *S. scleranthi* Desm.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна слабо проявляются либо отсутствуют. Пикниды полупогруженные, диаметром 125–140 мкм, рассеяны по пораженному участку. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии C-образные, цилиндрические, реже почти прямые, на концах закругленные, размером (16,0–)25,7–30,0(–35,0) × 2,0–3,0(–4,0) мкм (по моде 28,0 × 2,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (5,3–)9,0–14,0(–17,5) (по моде 9,0). Внутри содержат большое количество мелких липидных капель. Чаще имеется 1 четко прослеживаемая перегородка, реже перегородки отсутствуют.

Распространение в Беларуси: на листьях, стеблях, чашелистиках, прицветниках *Scleranthus perennis* L. (Caryophyllaceae), Минская область, Столбцовский район, окрестности д. Новый Свержень (MSKU-F 8911, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 19.08.2023).

Общее распространение: Европа, Северная Америка.

Примечание. Обнаружение фитопатогенного микромицета *S. scleranthi*, который является узкоспециализированным патогеном на растениях рода *Scleranthus* (Caryophyllaceae), можно ожидать на адвентивных видах этого рода [10].

Septoria stellariae Roberge ex Desm., Ann. Sci. Nat. Sér. 3, Bot. 8: 22 (1847) (см. вклейку, рис. 13).

Анаморфа: *S. stellariae* Roberge ex Desm.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна расплывчатые, без каймы, чаще желтые (беловатые) или коричневые. Пикниды полупогруженные, диаметром 70–125 мкм, рассеяны или сгущены с обеих сторон листовой пластинки, часть из них могут срастаться оболочками. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии I-образные, цилиндрические или нитевидно-цилиндрические, суженные на концах либо закругленные у основания и суженные на вершине, размером (27,0–)41,0–70,0(–110,0) × (1,5–)2,0–2,5(–3,0) мкм (по моде 80,0 × 2,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (11,7–)20,0–33,3(–50,0) (по моде 20,0). Перегородки четко прослеживаются, их количество составляет (0–)1–3(–5), чаще 3 шт.

Распространение в Беларуси: на листьях *Stellaria media* (L.) Vill. (Caryophyllaceae), Минская область, Несвижский район, г. Несвиж (MSKU-F 8496, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 20.06.2023) и д. Саска Липка (MSKU-F 8840, MSKU-F 8884, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 24.04.2023), г. Минск (MSKU-F 8528, коллектор М. Н. Нарейко, дата сбора 20.07.2017); на листьях и стеблях *S. graminea* L. (Caryophyllaceae), Минская область, Воложинский район, окрестности д. Бузуны (MSKU-F 9526, коллектор И. А. Федюшко, дата сбора 01.10.2023).

Общее распространение: Европа, Азия, Северная Америка, Австралия.

Примечание. См. примечание к *S. cerastii*. Кроме того, вид *S. stellariae* может быть обнаружен на *S. aquatica* (L.) Scop. (syn. *Myosoton aquaticum* (L.) Moench) [5].

***Stagonospora convolvuli* Deam. & House, Bull. New York State Mus. 188: 41 (1916). Obligate synonyms: *Paraphoma convolvuli* (Deam. & House) Gomzhina & Gasich, Mycological Progr. 19(3): 192 (2020) (см. вклейку, рис. 14).**

Анаморфа: *S. convolvuli* Deam. & House.

Телеоморфа: неизвестна.

Описание ex planta. Пятна неправильной формы, концентрически морщинистые, красно-бурые или бурые, со временем светлеющие. Пикниды полупогруженные, диаметром 140–200 мкм, рассеяны на верхней стороне листовой пластинки. Оболочка пикниды угловатой текстуры. Конидии цилиндрические, булавовидные, размером (6,0–)14,8–19,0(–22,0) × (2,0–)3,0(–4,0) мкм (по моде 18,0 × 3,0 мкм), при этом отношение длины к ширине конидии составляет (2,0–)4,8–6,1(–10,5) (по моде 5,0). Могут содержать множество липидных капель. Перегородки четко прослеживаются, их количество составляет (0–)1–2(–3), чаще 1 шт.

Распространение в Беларуси: на листьях *Convolvulus arvensis* L. (Convolvulaceae), Минская область, Мядельский район, г. Мядель (MSKU-F 9128/2, коллектор А. К. Храмцов, дата сбора 07.09.2012); на листьях *Calystegia sepium* (L.) R. Вг. (Convolvulaceae), Минская область, Мядельский район, г. п. Свирь (MSKU-F 8617/2, коллектор А. К. Храмцов, дата сбора 08.09.2012).

Общее распространение: Европа, Азия.

Примечание. Обнаружение *S. convolvuli* также можно ожидать на дикорастущих и культивируемых видах родов *Convolvulus* и *Calystegia* (Convolvulaceae). По данным работы [12], *S. convolvuli* является продуцентом элсинохрома А и лептосферодиона – антибиотических веществ, подавляющих развитие фитопатогенных бактерий и грибов.

Заключение

Идентифицированные 14 видов пикнидиальных септориоподобных микромицетов, которые были выявлены на 16 видах из 9 семейств цветковых растений, впервые указываются для микобиоты Беларуси.

Приведенные данные (уточненная морфометрия, симптомы поражения, иные виды микромицетов данной группы, которые можно обнаружить на отмеченных растениях) позволяют дополнить сведения о существующих видах пикнидиальных септориоподобных микромицетов Беларуси и обозначить провизорные виды.

Один из новых видов пикнидиальных септориоподобных микромицетов (*S. heterochroa*) может быть отнесен к чужеродному компоненту микобиоты, поскольку он строго приурочен к адвентивным растениям рода *Malva* (Malvaceae).

Библиографические ссылки / References

1. Quaedvlieg W, Verkley GJM, Shin H-D, Barreto RW, Alfenas AC, Swart WJ. Sizing up *Septoria*. *Studies in Mycology*. 2013;75: 307–390. DOI: 10.3114/sim0017.
2. Морочковский СФ, Зерова МЯ, Лавитска ЗГ, Смицка МФ. *Несовершенные грибы*. Киев: Наукова думка; 1971. 696 с. (Определитель грибов Украины; том 3).
3. Sutton BC. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. London: Commonwealth Mycological Institute; 1980. 696 p.
4. Мельник ВА. *Целомицеты СССР* [диссертация]. Ленинград: [б. и.]; 1986. 440 с.
5. Verkley GJ, Quaedvlieg W, Shin H-D, Crous PW. A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology*. 2013;75:213–305. DOI: 10.3114/sim0018.
6. Bubák F, Kabát JE. Some new imperfections from Bohemia and Tyrol. *Austrian Botanical Magazine*. 1904;54(1):22–31.
7. Бызова ЗМ, Васягина МП, Деева НГ, Калымбетов БК, Писарева НФ, Шварцман СР. *Несовершенные грибы – Fungi imperfecti (Deuteromycetes). Книга 3, Сферосидные*. Алма-Ата: Наука; 1970. 557 с. (Флора споровых растений Казахстана; том 5).
8. Марланд АГ. *Критический обзор рода Septoria применительно к флоре Эстонии*. Тарту: Научная литература; 1948. 224 с.
9. Мельник ВА. *Класс Coelomycetes*. Санкт-Петербург: Наука; 1997. 281 с. (Определитель русских грибов; выпуск 1).

10. Тетеревникова-Бабаян ДН. *Грибы рода Septoria в СССР*. Ереван: АН АрмССР; 1987. 479 с.
11. Xu D, Xue M, Shen Z, Jia X, Hou X, Lai D, et al. Phytotoxic secondary metabolites from fungi. *Toxins*. 2021;13(4):261. DOI: 10.3390/toxins13040261.
12. Boss D, Maurhofer M, Schläpfer E, Défago G. Elsinochrome A production by the bindweed biocontrol fungus *Stagonospora convolvuli* LA39 does not pose a risk to the environment or the consumer of treated crops. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007;59(1): 194–205. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00207.x.
13. Скворцов АК. *Гербарий. Руководство по методике и технике*. Москва: Наука; 1977. 199 с.
14. Saccardo PA. *Sylloge Fungorum. Volume 25*. Berlin: Friedländer and Sohn; 1931. 1093 p.
15. Сауткина ТА, Третьяков ДИ, Зубкевич ГИ, Козловская НВ, Парфенов ВИ, Блажевич РЮ и др. *Определитель высших растений Беларуси*. Минск: Дизайн ПРО; 1999. 472 с.
16. Билай ВИ. *Методы экспериментальной микологии*. Киев: Наукова думка; 1982. 240 с.
17. The Angiosperm Phylogeny Group, Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, Byng JW, Judd WS, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016;181(1):1–20. DOI: 10.1111/boj.12385.
18. Шмидт ВМ. *Математические методы в ботанике*. Ленинград: Издательство Ленинградского университета; 1984. 288 с.
19. Кабаков РИ. *R в действии. Анализ и визуализация данных в программе R*. Москва: ДМК Пресс; 2014. 580 с.
20. Savchuk SS. Adventive complex of flora species of Brest Polesie. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2012;2:22–28. Russian.
21. Масловский ОМ, Левкович АВ, Сысой ИП. *Государственный кадастр флоры Республики Беларусь. Основы кадастра. Первичное обследование 2002–2017 гг.* Минск: Беларуская навука; 2019. 599 с.
22. Дубовик ДВ, Дмитриева СА, Ламан НА, Лебедько ВН, Левкович АВ, Масловский ОМ и др. *Черная книга флоры Беларуси: чужеродные вредные растения*. Минск: Беларуская навука; 2020. 195 с.

Получена 30.04.2024 / исправлена 23.05.2024 / принята 24.05.2024.
Received 30.04.2024 / revised 23.05.2024 / accepted 24.05.2024.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 579(075.8)

Лысак В. В. Микробиология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 6-05-0511-06 «Биотехнология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» / В. В. Лысак, В. Е. Мямин, С. Л. Василенко ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 301 с. : ил. Библиогр.: с. 300–301. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/308813>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 07.02.2024, № 001207022024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов 1-й степени высшего образования специальностей 6-05-0511-06 «Биотехнология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика». Содержание ЭУМК посвящено изучению структурной организации клеток прокариот, питания микроорганизмов, особенностей энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов, генетики прокариот, систематики прокариот, взаимоотношений между микро- и макроорганизмами. Кратко описаны методы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях. Уделено внимание значению микроорганизмов в природе и применению их в различных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и промышленности.

УДК 581.1(075.8)

Демидчик В. В. Физиология растений [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец.: 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика» / В. В. Демидчик, Г. Г. Филиппова, С. Н. Филиппова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 124 с. : ил. Библиогр.: с. 123–124. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/309889>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 28.02.2024, № 003028022024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) с креативным компонентом по учебной дисциплине «Физиология растений» предназначен для студентов, обучающихся по специальности «биоинженерия и биоинформатика». Содержание ЭУМК предполагает повышение эффективности управления образовательным процессом и самостоятельной работой студентов по освоению учебной дисциплины «Физиология растений» с помощью внедрения в образовательный процесс инновационных образовательных технологий, в том числе с выраженным креативным компонентом.

УДК 612.019(075.8) + 591.1(075.8)

Сравнительная физиология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для студентов спец.: 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / БГУ ; сост. В. Б. Казакевич. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 78 с. : табл. Библиогр.: с. 77–78. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/310032>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 06.03.2024, № 004206032024.

В электронном учебно-методическом комплексе (ЭУМК) раскрываются основные цели и задачи дисциплины «Сравнительная физиология», дается краткое описание ее структуры. Теоретический раздел содержит систематизированные сведения по основным темам, которые изучаются в рамках курса. Практический раздел ЭУМК дает представление о структуре лабораторного практикума и темах лабораторных занятий. Раздел контроля знаний знакомит учащихся с проверочными вопросами и примерами заданий зачета. Вспомогательный раздел содержит программу курса, список рекомендуемой литературы и сетевых ресурсов.

УДК 591(075.8)

Мелешко Ж. Е. Общая зоология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец.: 6-05-0511-02 «Биохимия», профилизации «Аналитическая и фармацевтическая биохимия»; 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика»; 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика» / Ж. Е. Мелешко, О. Ю. Круглова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 148 с. : ил. Библиогр.: с. 147–148. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/312443>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 18.05.2024, № 008318052024.

Содержание электронного учебно-методического комплекса предполагает получение студентами фундаментальных знаний о многообразии животных организмов, специфических чертах морфофизиологической организации представителей различных систематических групп, особенностях их адаптаций и закономерностях организации в эволюционном развитии, роли животных в функционировании экосистем, значении их для человека, основах рационального природопользования и охраны животного мира.

УДК 614.8(075.8)

Безопасность жизнедеятельности человека [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 03 01 «Математика (по направлениям)», 1-31 03 02 «Механика и математическое моделирование», 1-31 03 08 «Математика и информационные технологии (по направлениям)», 1-31 03 09 «Компьютерная математика и системный анализ» / БГУ ; сост.: О. Д. Бичан, Л. К. Герасимова. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 192 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 185–192. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/313374>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 10.06.2024, № 008510062024.

Электронный учебно-методический комплекс содержит набор материалов, которые используются в учебном процессе: учебную программу, учебные пособия, включающие лекционный и практический материал по дисциплине, тематику и планы семинарских и практических занятий, теоретические вопросы и тесты для контроля знаний, темы для написания рефератов, вопросы для подготовки к зачету, список рекомендуемой литературы.

УДК 575.8(075.8)

Романовская Т. В. Эволюционная биология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 01 01 «Биология», 1-33 01 01 «Биоэкология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0521-01 «Экология», 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология» / Т. В. Романовская ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 139 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 138–139. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/313419>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 11.06.2024, № 009111062024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 1-31 01 01 «Биология», 1-33 01 01 «Биоэкология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0521-01 «Экология», 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология». Содержание ЭУМК предполагает формирование и развитие у студентов представлений о процессе эволюционного развития живой природы, механизмах, которыми определяется динамика и направленность биологической эволюции, методах, применяемых в области эволюционной биологии, и разнообразии теоретических концепций в этой научной дисциплине.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

| | |
|---|----|
| <i>Филицова Г. Г.</i> Роль пептидных гормонов в регуляции роста и развития растений и их адаптации к внешним факторам | 4 |
| <i>Гармаза Ю. М., Тамашевский А. В., Слобожанина Е. И.</i> Наноструктурированный оксид цинка: роль физико-химических свойств в биологической активности и потенциальной цитотоксичности материала | 24 |
| <i>Мыслейко М. А., Вечерек М. С., Маноян Дж. Г., Габриелян Л. С., Самович Т. В., Козел Н. В., Муравицкая А. О., Демидчик В. В.</i> Синтез биоводорода клетками зеленых микроводорослей и способы его стимуляции | 36 |

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ

| | |
|---|----|
| <i>Потапович А. И., Костюк Т. В., Шутова Т. Г., Костюк В. А.</i> Влияние кверцетина и его микроструктурированных форм на жизнеспособность клеток и деградацию ядерной ДНК в кератиноцитах человека при моделировании окислительного стресса | 46 |
|---|----|

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

| | |
|---|----|
| <i>Русакович А. А., Демидчик В. В.</i> Оценка эндогенного антиоксидантного потенциала белорусских сортов пива при его хранении в различной упаковке | 55 |
|---|----|

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

| | |
|--|----|
| <i>Степанова Е. С., Кукреш Г. В., Николайчик Е. А., Колубако А. В.</i> 9-цис-Эпоксикаротиноид-диоксигеназа как переключатель связанных с иммунитетом сигнальных путей растений <i>Solanum lycopersicum</i> | 63 |
|--|----|

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

| | |
|--|----|
| <i>Федюшко И. А.</i> Новые для Беларуси виды пикнидиальных септориоподобных микромицетов | 72 |
| Аннотации депонированных в БГУ работ | 88 |

CONTENTS

REVIEWS

- Filipstova H. G.* Role of peptide hormones in regulation of plant growth and development and their adaptation to environmental factors 4
- Harmaza Y. M., Tamashevski A. V., Slobozhanina E. I.* Nanostructured zinc oxide: role of physico-chemical properties into the biological activity and potential cytotoxicity of the material 24
- Mysleiko M. A., Vecherek M. S., Manoyan J. G., Gabrielyan L. S., Samovich T. V., Kozel N. V., Muravitskaya A. O., Demidchik V. V.* Synthesis of biohydrogen by green microalgae and methods of increasing it production 36

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

- Potapovich A. I., Kostyuk T. V., Shutava T. G., Kostyuk V. A.* Effect of quercetin and its microstructured forms on cell viability and nuclear DNA degradation in human keratinocytes when modelling oxidative stress..... 46

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

- Rusakovich A. A., Demidchik V. V.* Assessment of the endogenous antioxidant potential of Belarusian beers during its storage in different packaging..... 55

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

- Stepanova E. S., Kukresh G. V., Nikolaichik Y. A., Kalubaka N. V.* 9-*cis*-Epoxy-carotenoid dioxygenase as a switch of immunity-related signalling pathways in *Solanum lycopersicum* plants 63

BIODIVERSITY

- Fiadziushka I. A.* New species of pycnidial *Septoria*-like micromycetes for Belarus..... 72

- Indicative abstracts of the papers deposited in BSU..... 88

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Экспериментальная биология
и биотехнология.
№ 2. 2024**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Республика Беларусь.
Почтовый адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: jbiol@bsu.by
URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«Экспериментальная биология
и биотехнология» издается с января 1969 г.
С 1969 по 2016 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»,
с 2017 по 2021 г. – под названием
«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология».

Редактор *О. А. Семенец*
Технический редактор *В. В. Пижкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 28.06.2024.
Тираж 70 экз. Заказ 624.

Республиканское унитарное предприятие
«СтройМедиаПроект».
ЛП № 02330/71 от 23.01.2014.
Ул. В. Хоружей, 13/61, 220123,
г. Минск, Республика Беларусь.

© БГУ, 2024

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 2. 2024**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliezhnasci Ave.,
Minsk 220030, Republic of Belarus.
Correspondence address: 4 Niezaliezhnasci Ave.,
Minsk 220030, Republic of Belarus.
Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: jbiol@bsu.by
URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«Experimental Biology and Biotechnology»
published since January, 1969.
From 1969 to 2016 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»,
from 2017 to 2021 named «Journal of the Belarusian
State University. Biology».

Editor *O. A. Semenets*
Technical editor *V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 28.06.2024.
Edition 70 copies. Order number 624.

Republic Unitary Enterprise
«StroiMediaProekt».
License for publishing No. 02330/71, 23 January, 2014.
13/61 V. Haruzhaj Str.,
Minsk 220123, Republic of Belarus.

© BSU, 2024