тиями в борьбе с болезнями являются профилактические: удаление осенью больных и поломанных побегов. При сильном развитии пятнистости растения обрабатывают раствором каптана. Опрыскивание проводят в весенне-летний период между сборами чайного листа. На листосборных плантациях чая применение других фунгицидов не рекомендуется. Большое значение следует уделить профилактике болезней. С этой целью весной проводят систематическую прочистку кустов, с обязательным удалением сухих побегов, больных и опавших листьев.[7]

Производство культуры чая без применения подрезки представляется не целесообразным. Установлено, что в результате применения подрезки урожайность плантации значительно возрастает, облегчается сбор чайного листа и повышается производительность труда.

Список литературы

- 1.Зазараидзе Е.П. Болезни батата в Грузинской ССР.Груз.опытн. ст. защиты растений.Серия А: Фитопатология, 1940, №2, с.299-324
- 2.Нагорный П.И., Эристави Э.М. Краткий обзор болезней растений в Абхазии в 1928.Сухуми, 1929, с.28
- 3.Маминашвили Д.С. Некоторые вопросы биологии гриба, вызывающего церкоспортиоз чая. //Субтропические культуры, 1970, №1, с.157-160
- 4.Спешнев Н.Н. Материалы для изучения микотрофы Кавказа.-Труды Тбилисского ботан.сада, 1900, вып.4, с.113-117
- 5.Назарова Н.Г.Причины угнетения и выпада чайных кустов в условиях Азербайджана.//Субтропические культуры, г.Кутаиси, 2008, № 1-4, с.95-99
- 6.Источник: <https://www.tea-terra.ru/2013/11/18/10333/>
7. Источник: <https://www.tea-terra.ru/2016/11/24/28441/>

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В РАЗВИТИИ УСТОЙЧИВОСТИ К НО-НИТРОЗАТИВНОМУ СТРЕССУ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Васильева Светлана Васильевна,
д.б.н., Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия

Рыльская Анна Валентиновна,
студентка, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

Санина Наталия Алексеевна
в.н.с., Институт проблем физической химии РАН,
Черноголовка, Россия

[DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2018.4.57.6-10](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2018.4.57.6-10)

АННОТАЦИЯ:Изучена интерференция сигнальной молекулы оксида азота (NO) с защитной системой белков теплового шока (БТШ) в бактериальных клетках. Экспрессия генов регуляции систем резистентности *E. coli* к цитотоксическому действию донора оксида азота ТНКЖтио значительно возрастала при предварительной термической обработке клеток: на 40–50% увеличивалась экспрессия гена *sfiA* ДНК-SOS-репарационного ответа и на 19–30% экспрессия гена *soxS* в системе SoxRS [2Fe-2S]-репарации нитрозативных и супероксидных повреждений. Выдающиеся результаты взаимодействия систем получены при последовательной обработке клеток нагреванием и комплексом сигнальных газотрансмиттеров (донор NO ТНКЖтио + H₂S): показатели экспрессии *SoxRS*-регулона превышены в 2,8 раза (без учета индуцибельных БТШ) и более 4 раз – при обработке клеток с БТШ. БТШ на 15–20% снижали продуктивность формирования биопленок резистентности к окислительному стрессу, вызванному донором NO в клетках *Pseudomonas aeruginosa*. Витамин пара-аминобензойная кислота (ПАБК) и БТШ были негативными регуляторами процессов экспрессии генов резистентности клеток к NO.

ABSTRACT:Interplay of nitric oxide signaling molecule (NO) with the heat shock protein system (HSPs) in bacteria was studied. The gene expression of the regulation of *E. coli* resistance systems to cytotoxic effects of nitric oxide donor TNCthio increased significantly with the heat cell pre-treatment: an expression of the *sfiA* gene (the SOS DNA repair response) increased by 40–50%, while the *soxS* gene expression level (the SoxRS [2Fe-2S]-DNA repair of nitrosative and superoxide damages) increased by 19–30%. The outstanding results were obtained in the experiments with the successive cell treatment with heating and a complex of gasotransmitters (NO-donor TNCthio + H₂S): an expression level of the *SoxRS*-regulon was increased 2.8-fold (without the inducible HSPs) and more than 4-fold during the cell treatment (with HSPs). HSPs reduced the productivity of bacterial biofilm resistance to oxidative stress caused by NO donor in *Pseudomonas aeruginosa* by 15–20%. Vitamin para-aminobenzoic acid (PABA) and HSPs were the negative regulators of gene expression, induced by NO.

Ключевые слова: белки теплового шока (БТШ); доноры NO; репарация ДНК, оксидативный стресс.
Keywords: heat shock proteins (HSPs); NO donors; DNA repair; oxidative stress.

ВВЕДЕНИЕ

Тепловой шок вызывается системным воспалительным процессом, приводит к дисфункции раз-

личных органов и функционирует как система координированного синтеза универсальных защитных белков (БТШ). В *E. coli* крупные белки GroEL и GroES индуцируются и при тепловом шоке, и при

действии окислителей, голодании и УФ-излучении, обладая значительным структурным и функциональным сходством.

Функции БТШ многообразны. Полифункциональный БТШ DnaK, объем которого в *E. coli* при оптимальной температуре составляет около 1,4% от общего клеточного белка, избирательно индуцируется при обработке клеток H_2O_2 , налидиксовой кислотой, при УФ-облучении и голодании, но не индуцируется генераторами супероксид аниона O_2^- . Белок RecA – регулятор ДНК-SOS-репарационной системы, напротив, индуцируется O_2^- , но не связан с ответом теплового шока (ОТШ).

Функции универсальной сигнальной молекулы оксида азота также связаны с БТШ. Белок-шаперон теплового шока Hsp90 регулирует NO-сигнальную трансдукцию, образуя комплекс с растворимой sGC и прямо участвуя в доставке гема в sGC $\beta 1$ субъединицу для формирования соответствующей структуры и комплексообразования с NO [3]. БТШ семейства HSP-70 индуцируются донорами NO во всех изученных экспериментальных моделях [5].

Потенциальными мишенями в современных биологических исследованиях стали малые белки теплового шока – sHSPs. Это целое семейство белков с молекулярной массой 12–43 кДа. В их структурах в качестве домена содержится α -кристаллин – характерный признак малых БТШ. sHSPs – это АТФ-независимые молекулярные шапероны – регуляторы систем жизнеобеспечения. Один из них Hsp27 – молекулярный шаперон-регулятор индуцибельного апоптоза и резистентности при химиотерапии [10].

В условиях стрессов – оксидативного либо теплового – в клетках *E. coli* многократно – до 160 мкМ – возрастает концентрация малых динуклеотидов – алярмонов, таких как ArpprA (диаденозин 5',5'''-P¹,P⁴-тетрафосфат) – Ar_nA [2]. Эти структуры считались сигналами индукции стрессов [1], однако впоследствии была установлена их модуляторная функция и участие в процессах фосфорилирования. В *E. coli* Ar_nA ингибируют активность белка DnaK в ответе теплового шока [8] и не только специфически связываются с DnaK, но и с другими белками теплового шока и оксидативного стресса – GroEL, E89, C45 и C40, снижая их эффективность в защите клеток [4].

Образование комплекса индуцибельных белков синтеза NO (iNOS) с белками теплового шока семейства HSP-70 рассматривается в настоящее время как одна из основ защиты клеток млекопитающих от обширного окислительного стресса – геморрагического шока и кровоизлияний различного генеза. Молекулярно-генетические механизмы развития этого явления и основ его реанимации не установлены [5].

Цель настоящей работы – изучение взаимосвязи индуцибельных белков теплового шока и сигнальных функций оксида азота с развитием резистентности к окислительному стрессу в модельных генетических системах *E. coli*. Поиск низкотоксичных метаболитов – регуляторов донирования NO

железо-сера-нитрозильными комплексами в условиях *in vivo* и *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Кристаллический водорастворимый донор оксида азота – тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатом $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4] \cdot 4H_2O$ (ТНКЖтио) синтезирован в ИПХФ РАН, Черноголовка. Водный раствор ТНКЖтио – это тиосульфат дианиона, $Fe_2[(S_2O_3)_2(NO)_4]^{2-}$, очень стабильный и в твердом состоянии, и в растворе. В медицине – перспективный онколитик. В качестве позитивного контроля экспрессии гена *sfiA* использован 2,63 нМ водный раствор нитрохиолин-1-оксида (4НХО, «Sigma», США), а гена *soxS* – 0,5 мМ водный раствор менадиона («Serva», ФРГ). Хромоген *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG, «Sigma», США). Ципрофлоксацин (CF, 0,1 μ M) – ингибитор формирования биопленок, использован как позитивный контроль.

Экспрессия генов. В работе изучены бактериальные культуры, содержащие в геноме слитые опероны: *E. coli* PQ37 [*sfiA::lacZ*] – для идентификации экспрессии гена *sfiA* в мультифункциональном ДНК-SOS-репарационном ответе с формированием ОР и ДР разрывов в ДНК; *E. coli* OG100 *ΔoxyR4* [*sfiA::lacZ*] с делецией гена в системе OxyR-защиты от оксидативных повреждений – для идентификации ОН⁻-радикалов в спектре генотоксиканта; *E. coli* TN530 λ φ(*ΔsoxS'::lacZ*) с белком-регулятором SoxR[2Fe-2S] – для идентификации нитрозативных и супероксидных (O_2^-) радикалов. Штаммы *E. coli* PQ37 и OG100 получены от М.Хофнунга (M.Hofnung, Институт Пастера, Париж, Франция), а *E. coli* TN530 – от Т.Nunoshiba (Япония).

В тестерных штаммах структурный ген β -галактозидазы *lacZ* помещен под контроль промотора гена *sfiA* SOS-регулона либо промотора *soxS* SoxRS-регулона, а в геноме имеется делеция хромосомного *lac*-оперона. Это позволяет измерять экспрессию генов *sfiA* и *soxS* опосредованно, по активности фермента LacZ β -галактозидазы в колориметрическом тесте [7]. Состав буфера для определения активности β -галактозидазы приведен в работе [7]. Использован спектрофотометр PD-303UV (Apel Co. Ltd, Япония). Активность β -галактозидазы рассчитана по формуле: $A = (1000 \times OD_{420} \times V) / (OD_{600} \times t)$, где OD_{420} и OD_{600} – величины поглощения при 420 и 600 нм, соответственно, V – разведение, t – время инкубации с хромогеном, мин.

Биопленки антибиотикорезистентности. Клетки патогена *Pseudomonas aeruginosa* PA103 – использованы в изучении продуктивности формирования биопленок антибиотикорезистентности по стандартному протоколу [9]. Продуктивность формирования биопленок рассчитана по формуле: $B = OD_{570} / OD_{600}$, где OD_{570} и OD_{600} – спектрофотометрические показатели при 570 и 600 нм.

Индукция белков теплового шока. Суспензию бактериальных клеток нагревали на водяной бане в течение 15 мин при 43 °C до основной обработки, в соответствии с целью исследования.

Погрешности рассчитаны при доверительной вероятности $P=0,95$. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе впервые изучена интерференция защитных клеточных систем – белков теплового шока и репарации ДНК от окислительных повреждений, вызванных донором оксида азота ТНКЖтио в *E. coli*.

Рисунок 1. Белки теплового шока стимулируют экспрессию гена *sfiA* в *E. coli* PQ37, индуцированную газотрансммитерами NO и H₂S

Обработка клеток донором оксида азота в 2,7 раза усиливала экспрессию гена *sfiA* SOS-регулона – при 5,7-кратном показателе в позитивном контроле с 4НХО (Рис. 1). При комплексной обработке ТНКЖтио + H₂S (1:1) экспрессия гена *sfiA* в 1,3 раза превышала показатель спонтанного фона. Этот результат несколько ниже тех, которые были получены нами в альтернативных исследованиях на *E. coli* при изучении комплекса ТНКЖтио + H₂S в молярном соотношении (1:10).

Внесение 0,1–1,0 мМ ПАБК в клеточную суспензию способствовало снижению экспрессии гена *sfiA* SOS-регулона на 37–47%, в сравнении с монообработкой NO-донором. Это согласуется с ингибированием ПАБК всего комплекса индуцибельных генетических функций, составляющих глобальный ДНК-SOS-репарационный ответ в *E. coli* и следствием снижения донирования NO раствором

ПАБК + NO и последующего внутриклеточного формирования на основе NO сигнальных молекул ДНКЖ и даже комплексов ПАБА/NO [6].

Индукция белков теплового шока аддитивно усиливала экспрессию гена *sfiA* защиты от нитрозативного стресса ДНК-SOS- системой репарации при всех вариантах обработки клеток (Рис. 1).

Ранее мы установили, что БТШ ингибировали экспрессию генов защитных SOS- и SoxRS-регулонов *E. coli* от окислительных стрессов, вызванных перекисью водорода, менадионом и 4НХО. Информация об усилении БТШ резистентности этих клеток (по критерию снижения продуктивности формирования биопленок) к стрессам, в экспериментах с оксидом азота либо суммой газотрансммитеров [NO + H₂S], получена нами впервые.

Рисунок 2. Стимуляция БТШ экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530, индуцированной NO и H₂S.

При комплексной обработке газотрансмиттерами NO + H₂S (без БТШ) установлен рост в 2,8 раза индукции гена *soxS* *SoxRS*-регулона. В клетках с предварительной индукцией БТШ это превышение было 4-х кратным.

Таким образом, накопление в клетках индуцированных белков теплового шока аддитивно усиливало экспрессию генов *sfiA* и *soxS* глобальных систем репарации ДНК от окислительного стресса при всех вариантах обработки клеток.

Рисунок 3. Ингибирование белками теплового шока продуктивности формирования биопленок в клетках *Ps. aeruginosa*, индуцированных ТНКЖтио.

Индукция БТШ в клетках *Ps. aeruginosa* снижала продуктивность формирования биопленок резистентности к ципрофлоксацину – на 32%, а к ТНКЖтио – на 15%. Этот результат есть проявление негативной интерференции между индуцибельными альтернативными ДНК-репарационными ответами в клетках и клеточного гомеостаза.

Впервые изучена регуляция БТШ активности систем репарации окислительных повреждений ДНК различного генеза и ее зависимость от структуры этих систем. БТШ активировали SOS- и

SoxRS-системы защиты ДНК от окислительных повреждений во всех вариантах, за исключением летального действия гидроксильных радикалов OH⁻ в *ΔoxyR4*-делеционном мутанте – штамме *E. coli* OG100 *ΔoxyR4*.

Одной из задач проведенного исследования был поиск перспектив дополнительного использования витамина ПАБК, предшественника в синтезе пуринов и тимина в биосистемах, в качестве регулятора донирования NO *in vivo*. Этот выбор мы

обосновали представленными ранее доказательствами *in vitro* о значительном снижении ПАБК уровней выделяемого NO железом-сера нитрозильными комплексами – известными донорами NO. В проведенной работе установлено снижение ПАБК уровней экспрессии генов ДНК-репарационных процессов в клетках *E. coli* при их совместной обработке ТНКЖтио + ПАБК. Это может быть и результатом внутриклеточного формирования комплексов PABA/NO [6].

Формирование комплекса двух индуцибельных белков синтеза NO (iNOS) и БТШ HSP-70i, рассматривается в настоящее время как одна из основ защиты клеток млекопитающих от обширного окислительного стресса – геморрагического шока и кровоизлияний. Молекулярно-генетические механизмы этого явления не установлены, однако известно, что в клетках увеличивается активность клеточной каспазы-3 и снижается уровень АТФ. Суммарная суперэкспрессия БТШ, ингибирование индукции синтеза оксида азота и стимуляция синтеза АТФ может остановить развитие этого явления. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах использования клеточного метаболита ПАБК – предшественника синтеза пуринов и тимина – в создании программ предотвращения шоковых состояний.

Литература

1. Bochner B.R., Lee P.C., Wilson S.W., Cutler C.W., Ames B.N. AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. //Cell. 1984. Vol. 37, N 1. P. 225-232.
2. Farr S.B., Arnosti D.N., Chamberlin M.J., Ames B.N. An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli* //Proc. Natl Acad. Sci. 1989. Vol. 86, N 13., 5010-5014.
3. Ghosh A., Stuehr D.J. Regulation of sGC via hsp90, cellular heme, sGC agonists, and NO: new pathways and clinical perspectives //Antioxid Redox Signal. 2017. Vol. 26, N 4. P. 182-190.
4. Johnstone D.B., Farr S.B. AppppA binds to several proteins in *Escherichia coli*, including the heat shock and oxidative stress proteins DnaK, GroEL, E89, C45 and C40 //EMBO J. 1991. Vol. 10, N 12. P. 3897-3904.
5. Kiang J. G. Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury //Cell Research. 2004. Vol. 14, N 6. P. 450-459.
6. Kim Y., Maciag A.E., Cao Z., Deschamps J.R., Saavedra J.E., Keefer L.K., Holland R.J. PABA/NO lead optimization: Improved targeting of cytotoxicity to glutathione S-transferase P1-overexpressing cancer cells //Bioorganic and Medicinal chemistry. 2015. Vol. 23, N 15. P. 4980-4988.
7. Quillardet P., Huisman O., D'ari R., Hofnung M. The SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity //Proc. Natl Acad. Sci. 1982. Vol. 79, N 19. P. 5971-5975.
8. Tilly K., McKittrick N., Zylicz M., Georgopoulos C. The DnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli* //Cell. 1983. Vol. 34, N 2. P. 641-646.
9. Wu Y., Outten F.W. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression //J. Bacteriol. 2009. Vol. 191, N 4. P. 1248-1257.
10. Zeng L., Tan J., Lu T., Lei Q., Chen C., Hu Z. Small heat shock proteins and endoplasmic reticulum: potential attractive therapeutic targets? //Current Molec. Medicine. 2015. Vol. 15. P. 38-46.

УДК 598.292.2

РАЗНООБРАЗИЕ ВАРИАНТОВ РАЗМЕЩЕНИЯ ГНЕЗД ДРОЗДОВ *TURDUS MERULA* И *TURDUS PHILOMELOS* НА СУБСТРАТЕ.

Джигерова Фарида Мирзекулиевна

научный сотрудник

Заповедник Дагестанский, г. Махачкала

АННОТАЦИЯ. В статье приводятся данные о размещении гнезд дроздов на субстрате. Даются схемы расположения гнезд в зависимости от архитектурной формы деревьев и кустарников.

ABSTRACT. The article provides data on the placement of the thrushes' nests on the substrate. The nests layouts are given depending on the architectonic shape of trees and bushes.

Ключевые слова: гнезда, черный дрозд, певчий дрозд, субстрат, Касумкентский заказник.

Keywords: nests, blackbird, song thrush, substrate, Kasumkentsky reserve.

Введение. Данная работа проведена с целью выявления особенностей дислокации гнезд дроздов на различном субстрате. Для осуществления цели были поставлены следующие задачи: установить значение разных пород деревьев и кустарников для гнездования дроздов с учетом характера размещения и закрепления гнезд на субстрате; показать основные варианты дислокации гнезд на древесной растительности (у главного, бокового ствола, на

ветвях и т. п.); влияние архитектуры и толщины ветвей на помещение гнезд; синантропные тенденции в размещении гнезд дроздов.

Материалы и методы. Основной материал был собран на территории Касумкентского заказника в 2013-2015 гг. Также включены данные о нахождении гнезд черного дрозда в подвале дома (с. Эминхюр в 2012 г.) и на обочине дороги у стены (с. Касумкент в 2012 г.). Всего за период наблюдений