

УДК 57.088.1

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ (ОБЗОР)

© 2025 г. Л. В. Трилисенко¹, Т. В. Кулаковская^{1, *}

¹ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, 142290 Пушкино, Россия

*e-mail: alla@ibpm.ru

Поступила в редакцию 18.03.2025 г.
После доработки 29.06.2025 г.
Принята к публикации 03.07.2025 г.

Неорганические полифосфаты (**полиР**) являются универсальными регуляторными соединениями и участвуют в контроле экспрессии генов, адаптации к стрессам, мембранном транспорте, обеспечении клеточной подвижности. Установлена их важная роль в развитии костной ткани, тромбообразовании, воспалительном ответе, в передаче сигналов в нервных клетках и образовании амилоидов. Эти полимеры являются участниками гомеостаза фосфора не только в отдельных организмах, но и в природных и техногенных экосистемах. ПолиР используются в качестве удобрений, пищевых добавок, применяются для умягчения воды и подавления воспламенения в составе красок и полимерных материалов. Современные высокочувствительные и специфичные методы анализа полиР важны как для решения фундаментальных проблем регуляции биохимических процессов, так и для ряда практических задач, таких как контроль состояния объектов окружающей среды, качества пищевых продуктов и разработки новых методов лечения заболеваний костной ткани, сердечно-сосудистой системы и нейродегенеративных патологий. В настоящее время разработаны эффективные и высокоспецифичные методы определения полиР, такие как специальные методы экстракции, энзиматический анализ, электрофорез, окраска флуорохромом DAPI, а также микроскопические методы, включая микрорентгеновский анализ. Сохраняет свое значение ЯМР, в особенности для определения длины цепи полимера. В данном обзоре мы рассматриваем методы анализа полиР с точки зрения задач, решаемых при исследовании различных биологических объектов, с особым вниманием к наиболее современным и широко распространенным подходам.

Ключевые слова: неорганические полифосфаты, экстракция, энзиматический анализ, электрофорез, ЯМР, флуоресцентная микроскопия, длина цепи

DOI: 10.7868/S3034574X25060011

Неорганические полифосфаты, линейные полимеры ортофосфорной кислоты, относительно недавно считали микробными запасниками фосфора, “молекулярным ископаемым”, предшествовавшими АТФ в эволюции энергетического метаболизма [1, 2]. Однако уже в монографии И.С. Кулаева [3] были суммированы данные о том, что полиР присутствуют в клетках всех живых существ, от прокариот до человека, и высказана идея об их роли в качестве универсальных регуляторов метаболических процессов. В настоящее время многочисленными доказательствами того, что полиР у микроорганизмов не только играют решающую

роль в гомеостазе фосфора, но и участвуют в контроле экспрессии генов, адаптации к стрессам, мембранном транспорте, вирулентности обобщены в ряде обзоров [4–8].

Раскрытие роли полиР у млекопитающих внесло существенный вклад в развитие представлений о значении фосфорного обмена для физиологических процессов в норме и патологии (рис. 1). Особое значение принадлежит полиР в процессах роста и регенерации кости. В остеокластах накапливаются электроноплотные гранулы, содержащие высокую концентрацию кальция и полиР с длиной цепи около 60 фосфатных остатков [9, 10]. В результате



Рис. 1. Современные и перспективные направления практического использования неорганических полифосфатов.

экзоцитоза эти гранулы выходят во внеклеточное пространство, где щелочная фосфатаза гидролизует полиР до ортофосфата (Pi). При участии специфических белков из высвобождающихся Pi и кальция формируется структурированный апатит кости [9, 10]. Гранулы, содержащие полиР, присутствуют также в тромбоцитах [11]. При разрушении тромбоцитов полиР выходит в кровь, где участвуют в каскаде свертывания, связываясь с фактором XII и активируя его, а затем эти полимеры и ионы кальция входят в состав тромба, увеличивая его стабильность [11]. ПолиР крови являются участниками воспалительного ответа [11]. Комплексы этих полиР с ионами кальция образуют микрочастицы, которые удерживаются на поверхности прокоагулянтных тромбоцитов, и инициируют систему, управляемую фактором XII, запуская провоспалительные и прокоагулянтные реакции через калликреин-кининовую систему [12]. ПолиР входят в состав специфического кальциевого канала мембран митохондрий, регулирующего уровень кальция и стрессовый ответ в этих органеллах [13, 14]. В нервной системе полиР являются медиаторами сигналов между астроцитами посредством активации пуриnergических рецепторов [15].

ПолиР участвуют в образовании фибрилл амилоидогенных белков [16, 17], в связи с чем обсуждается возможная роль этих полианионов в нейродегенеративных заболеваниях, таких как боковой амиотрофический склероз (БАС), лобно-височная деменция (ЛВД), болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [18, 19]. Недавно было

показано, что длинноцепочечный полиР способен усиливать барьерную функцию клеток кишечника и его применение приводит к клинической ремиссии при язвенном колите [20]. Изучение роли неорганических полиР в организме человека признается перспективным для разработки новых методов лечения заболеваний костной, кровеносной и нервной систем [19, 21].

Микроорганизмы, накапливающие полиР, играют ключевую роль в круговороте фосфора в природных и техногенных экологических нишах. Ряд микроорганизмов океана концентрируют фосфат в виде внутриклеточных полиР в поверхностных слоях вод, а затем в донных отложениях полиР либо используются в качестве источника энергии, либо происходит гибель этих микроорганизмов. При этом в обоих случаях высвобождается фосфат и при этом может происходить осаждение апатитов [22, 23]. Актуальной также является задача очистки стоков от избытка фосфата и последующего использования фосфатов, накопленных в активированных илах. Исследования так называемого процесса усовершенствованного биологического удаления фосфата (EBPR — Enhanced Biological Phosphorus Removal), обобщенные в ряде обзоров, свидетельствуют о важной роли микроорганизмов, накапливающих полиР в технологических процессах, направленных на сохранение окружающей среды и рециклинг фосфора [24, 25].

ПолиР применяются в хозяйственной деятельности для умягчения и очистки воды [26], в качестве фосфорных удобрений пролонгированного

действия [27]. Они входят в состав композитов для получения огнестойких материалов [28] и являются разрешенной пищевой добавкой в кондитерских и колбасных изделиях, в замороженных рыбных и мясных продуктах для сохранения влаги и мягкого антисептического действия [29, 30]. Широкое применение полифосфатов в сельском хозяйстве и пищевой промышленности (рис. 1) может приводить к изменению количества минерального фосфора, попадающего в организм человека и, соответственно, влиять на процессы, которые контролируются неорганическими полиР.

Отметим также новые перспективные направления применения неорганических полиР в медицине, такие как использование их в составе костных имплантов [31, 32], зубных паст [33], а также в составе наночастиц для адресной доставки лекарственных средств в органы и ткани [34, 35].

Несмотря на свою структурную простоту, полиР играет важную роль в чрезвычайно широком спектре биологических процессов у микроорганизмов, в организме животных и человека, а также в фосфорном гомеостазе экосистем. Фундаментальные исследования этой роли, а также разработка новых биотехнологий рециклинга фосфата, диагностики и лечения заболеваний, связанных с нарушением минерального фосфорного обмена у человека требуют специфических методов анализа этих полимеров в различных биологических объектах. В настоящее время разработаны чувствительные и специфические методы, позволяющие проводить анализ содержания и степени полимерности полиР в различных биологических образцах, а также оценивать их локализацию в клетках. В связи с возрастающим интересом к исследованию полиР в биологических системах, в литературе имеется несколько обзоров, посвященных методам анализа этих полимеров [36–39]. Отметим, что обзоры несут авторский взгляд на проблему, в том числе в них иногда встречаются фактические ошибки. Так в обзоре Тагауре [36] ошибочно указано, что для ^{31}P -ЯМР нужны меченные соединения. В обзоре Бру [37] для сравнительного анализа эффективности методов извлечения полиР из клеток дрожжей разными авторами используют некорректное сравнение, поскольку авторы процитированных работ культивировали дрожжи в разных условиях, что приводит к разному содержанию полиР в клетках.

В настоящем обзоре рассматриваются методы анализа полиР с точки зрения задач, решаемых при исследовании различных биологических объектов, особое внимание уделяя наиболее современным и широко распространенным подходам.

Методы экстракции. Экстракция полиР из клеток и тканей является во многих случаях необходимым этапом для последующего качественного и количественного анализа этих соединений. Методы экстракции основаны на полианионных

свойствах полиР. Эти методы имеют множество модификаций, связанных с особенностями объектов исследования, взаимосвязью полиР с различными компонентами клетки и клеточными структурами, а также с задачами исследования [40]. В силу лабильности полиР экстракцию чаще всего проводят при 0°C [40].

Методы экстракции можно подразделить на две группы. Первая – это, когда с помощью тех или иных реагентов стараются максимально извлечь все полиР, содержащиеся в образце, и весь пул полиР оказывается в виде одной фракции [37, 41, 42]. Вторая группа – это последовательное использование разных экстрагентов и получение нескольких фракций полиР, различающихся по длине цепи, и предположительно, локализации в клетке [43–46]. В основе всех этих методов лежит обработка образцов растворами кислот и щелочей или реагентами для извлечения нуклеиновых кислот.

Для экстракции полиР растворами кислот чаще всего применяют 0.5–1 М хлорную кислоту при $0\text{--}4^\circ\text{C}$, причем как для клеток микроорганизмов [3, 37] так и для клеток млекопитающих [42, 47]. Растворы серной кислоты применяются редко [48], во избежание окисления органических соединений. Отметим, что не все биологические объекты содержат так называемые кислоторастворимые полиР, которые извлекаются в данных условиях. Так у *Escherichia coli* такие полиР не были обнаружены [49]. У некоторых бактерий для успешной экстракции полиР растворами кислот и щелочей клетки необходимо предварительно обработать смесью хлороформа-метанола для разрушения мембран [50]. Раствор холодной хлорной кислоты обычно извлекает не все полиР из клеток. Для оценки общего содержания полиР остаток биомассы обрабатывают горячей хлорной кислотой, гидролизуя оставшийся в биомассе полиР до P_i . Обычно кислоторастворимые полиР являются относительно короткоцепочечными [45, 51]. Количество более длинноцепочечных полиР можно определить по выделившемуся P_i в результате обработки горячей хлорной кислотой. Этот способ определения содержания полиР используют, когда достаточно сравнить уровни полиР в клетках родительского и мутантных штаммов микроорганизмов или при изменении физиологических условий культивирования [52, 53].

Для извлечения максимального количества полиР в одну стадию наиболее эффективно использование экстрагентов, применяемых для нуклеиновых кислот в силу сходства полианионных свойств этих соединений и полиР. ПолиР экстрагируются совместно с ДНК и РНК растворами фенола или гуанидинизотиацианата, а также реагентом для выделения нуклеиновых кислот под фирменным названием Trizol, содержащим оба компонента. В некоторых случаях к экстра-

гирующим растворам добавляют хлороформ для удаления фенола, детергент SDS для разрушения мембран, иногда добавляют ЭДТА для разрушения комплексов полиР с металлами. Считается, что экстракция фенолом дает наибольшее количество извлекаемого полиР по сравнению с другими методами, в частности для клеток дрожжей [37, 41, 54] и клеток млекопитающих [39].

Все способы экстракции приводят к тому, что в полученных препаратах кроме полиР присутствуют нуклеиновые кислоты и нуклеотиды. Для очистки полиР используют следующие подходы. Простейшим способом является сорбция органических соединений на активированный уголь "Norit A" [55]. Используют также обработку РНКазами и ДНКазами [37, 39, 41], хотя имеются сообщения о возможности деградации полиР РНКазами [56]. Во многих протоколах для очистки полиР применяются микроколоники на основе диоксида кремния [37, 39, 41], хотя это и приводит к потерям полиР [37]. Эти колонки позволяют разделить длинноцепочечные и короткоцепочечные полиР. Короткоцепочечные полиР обычно обнаруживаются в проточной жидкости, в то время как длинноцепочечные полиР обнаруживают во фракциях при элюции [37]. Но в объединенных фракциях общее количество полиР, элюированных с колонок оказывается на 30% ниже, чем полученное при осаждении этанолом [37].

Ниже приведен пример методики, позволяющей извлечь полиР в виде одной фракции [41]. Биомассу промывали буфером с добавлением 2.5 мМ ЭДТА, встряхивали с фенолом, уравновешенным 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 7.5–8.0 буфером (300 мкл на 25 мг сырой биомассы). Затем инкубировали 10 мин при 45°C, после чего быстро охлаждали и встряхивали с 1 мл хлороформа, центрифугировали 5 мин при 12000 g. Верхнюю водную фазу, содержащую экстракт полиР, отбирали и хранили при –20°C для количественного определения полиР. Авторы утверждают, что по сравнению с другими известными методами в этом случае извлекается весь пул клеточных полиР [41]. Методика может быть дополнена обработкой фракции полиР препаратами ДНКазы и РНКазы с последующим осаждением полиР 70%-ным этанолом [37].

Последовательное использование для экстракции полиР нескольких различных реагентов позволяет получить фракции полиР, различающиеся по длине цепи. Этот подход важен в первую очередь для исследования клеток микроорганизмов, содержащих значительное количество полиР с различными длинами цепи.

Так, для экстракции полиР из клеток бактерий *Propionibacterium shermanii* [43], клетки подвергали последовательной экстракции при 0°C 2%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ), затем смесью ТХУ и ацетона (0.7% ТХУ : 67% ацетона) и, наконец,

67%-ным ацетоном, каждый раз осаждая клетки центрифугированием. К объединенному супернатанту добавляли равный объем фенол-хлороформа (1 : 1) насыщенного 0.1 М ацетатом аммония, рН 6.5. Смесь встряхивали и после расслоения отбирали водную фазу, содержащую фракцию короткоцепочечных полиР. Затем клетки суспендировали в 2 мМ ЭДТА, довели титрованием 0.2 М LiOH до рН 7–8, осаждали центрифугированием и в супернатанте получали фракцию длинноцепочечных полиР. Далее эту процедуру повторяли еще раз, но в конце добавляли смесь фенола и хлороформа (1 : 1), энергично встряхивали и осаждали.

Супернатант содержал гранулы длинноцепочечных полиР. Обработку органическими растворителями проводили при комнатной температуре. Данный метод экстракции позволил выделить три фракции полиР, различающиеся длиной цепи [45].

Сравнение многостадийных методов, примененных к клеткам дрожжей, приводит к заключению, что наиболее эффективным, хотя и достаточно трудоемким является метод Лангена и Лисса [44] с последующей модификацией [57, 58]. Клетки *S. cerevisiae* последовательно обрабатывали при 0–2°C 0.5 М раствором хлорной кислоты, затем насыщенным раствором хлорнокислого натрия, после чего растворами NaOH (рН 9–10 и 0.05 М) и наконец 0.5 М хлорной кислотой при 90°C. В результате получали четыре фракций полиР: кислоторастворимую (полиР1), солерастворимую (полиР2), две щелочерастворимых (полиР3 и полиР4). Содержание полиР5, гидролизуемых горячей хлорной кислотой, определяли по образующемуся Pi. Обработка биомассы после выделения первых четырех фракций 30 мМ раствором ЭДТА, рН 7.0, позволяет выделить фракцию полиР5 в полимерной форме [58]. С помощью P³¹-ЯМР-спектроскопии и электрофореза была определена средняя длина цепи полиР для *S. cerevisiae* [45, 58, 59], которая составила 10–20, 20–50, 60–120, 100–200 и свыше 200 фосфатных остатков для фракций полиР1, полиР2, полиР3, полиР4 и полиР5 соответственно. Выделение этих фракций представляет интерес поскольку их количество и длина цепи зависят от концентрации Pi [59], источника углерода [60] и других факторов внешней среды [61], а также генетических модификаций обмена полиР [55, 62]. Такой подход позволяет определить связь отдельных фракций с различными процессами в клетке и особенности путей их образования и функций.

В связи с многочисленностью литературы, не представляется возможным провести детальное сравнение методов экстракции полиР, поэтому остановились на их общей характеристике. Выбор метода экстракции зависит от поставленных целей, задач, биологического объекта. В зависимости от объекта исследования приходится модифици-

ровать существующие методы [3, 37, 41, 40, 48]. В опубликованных обзорах по методам исследования полиР для разных биологических систем имеется сравнительный анализ методов экстракции полиР применительно к клеткам дрожжей [37, 41], микроскопических водорослей [63], активированным илам и микроорганизмам, обитающим в этой экологической нише [36], клеткам и тканям млекопитающих [39].

Химический анализ полиР. В прошлом веке для идентификации полиР использовали гидролиз по методу Thilo [64], который приводит к образованию циклотрифосфата, идентифицируемого хроматографически. Тогда же использовались многочисленные методы хроматографии этих соединений на бумаге и ионообменных носителях [65]. В настоящее время эти методы не применяются в биохимии полиР в силу трудоемкости и малой чувствительности, однако хроматография полиР на ионообменных носителях продолжает применяться при анализе химически синтезированных полиР разной структуры [66]. Гель-фильтрация коммерческих препаратов полиР на сефадексе G-10 [67] применяется для очистки от примесей Pi и пирофосфата, что важно для получения чистых препаратов полиР при исследовании полиР-метаболизирующих ферментов. Осаждение полиР в виде солей бария, которое ранее применяли для их очистки и идентификации [59], до сих пор используется при необходимости концентрирования полиР из экстрактов для последующих анализов [55]. К экстрактам добавляют по каплям насыщенный раствор $Ba(NO_3)_2$ до легкого помутнения, оставляют на ночь, центрифугируют и переводят осадок полиР в растворимую NH_4^+ – форму с помощью катионообменной смолы Dowex 50 WX8. Все операции проводят при 4°C [59]. Для осаждения полиР используют также ацетат бария, добавляя его до конечной концентрации 0.1 М при pH 4.5 и осаждая полиР в течение 4 ч при 4°C [68], или абсолютный этанол [37].

Простейший способ химического анализа полиР в экстрактах – это гидролиз в 1 М HCl в течение 10 мин при 100°C и последующее колориметрическое определение высвободившегося Pi [52]. Этот Pi называется “лабильным фосфором”. При таком способе гидролиза Pi выделяется из нуклеозидфосфатов [40], но не из нуклеиновых кислот [69]. Для того, чтобы исключить вклад этих соединений в образование Pi, их удаляют сорбцией на активированный уголь [40, 55, 70]. Лабильный фосфор, определяемый после такой обработки, относится к полиР. Данный способ удобен для анализа большого количества образцов, дешев и адекватен для массового сравнительного анализа экстрактов из хорошо изученных объектов для разных физиологических условий и мутантных штаммов [53].

Определение длинноцепочечных полиР по метахроматическому сдвигу в спектре поглощения толуидинового голубого [70] имеет множество ограничений в связи со способностью других соединений связываться с этим красителем, но продолжает применяться [71, 72].

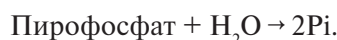
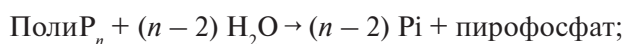
Метод титрования концевых групп. Данный метод определения степени полимерности полиР применяется в основном в химии фосфорных соединений [73]. Он прост, не требует дорогостоящего оборудования, поэтому сохраняет свое значение при анализе полиР, полученных синтетическим путем, в том числе для нужд пищевой промышленности, сельского хозяйства и других отраслей [66, 74, 75]. Для определения степени полимерности полиР данным методом в зависимости от длины цепи требуется от одного до нескольких десятков граммов полимера, чем длиннее цепь, тем большее количество образца необходимо. В связи с низкой чувствительностью и требованием высокой чистоты препарата, метод кислотно-основного титрования редко применяется для биологических объектов [38, 70].

Образец полиР в кислой форме (pH ~ 2–3) титруют раствором NaOH [75, 76]. В молекуле линейного полиР (в H^+ -форме) имеются средние сильно-кислые группы (область титрования от pH 2 до 4) и концевые слабокислые группы по две в каждой молекуле полимера (область титрования от pH 7 до 9). Концентрации групп определяют по расходу гидроксильных ионов при титровании. Кривая титрования имеет два перегиба при указанных значениях pH [76]. Концентрация средних сильно-кислых групп позволяет определить число атомов фосфора в молекуле. Концентрация концевых слабокислых групп с последующим делением ее на 2 соответствует концентрации полимера в образце [41, 66]. Циклические полиР не имеют конечных слабокислых групп, следовательно, определить длину их цепи методом титрования невозможно. Сравнительный анализ методов определения длины цепи с помощью титрования и ^{31}P ЯМР, а также кривые титрования для синтетических полиР приведены в работе [75].

Энзиматический анализ. Метод отличается высокой специфичностью. Несколько ферментов полифосфатного обмена микроорганизмов были предложены для количественного определения полиР. Первым из них была бактериальная полифосфаткиназа [54]. Метод основан на превращении с помощью полифосфаткиназы АДФ в АТФ за счет полиР, содержащихся в пробе. Образующийся АТФ измеряли люциферин-люциферазным методом [54]. Однако в дальнейшем этот метод вышел из употребления, поскольку был разработан более дешевый и простой метод с использованием дрожжевой полифосфатазы Ppx1 [77, 78]. Этот фермент, кодируемый геном *PPX1 (YHR201C)*, гидролизует

полиР с различной длиной цепи с близкой активностью, начиная от триполифосфата, но не гидролизует пирофосфат [67]. Образующийся при этом Рi определяют простыми колориметрическими методами. Методы определения Рi основаны на образовании его комплекса с гептамолибдатом аммония, количество которого измеряют либо непосредственно [79], либо после его восстановления аскорбиновой кислотой до молибденовой сини [80], либо после образования комплекса с красителем малахитовым зеленым [81, 82]. Метод определения фосфатов после восстановления фосфомолибденового комплекса аскорбиновой кислотой входит в ГОСТ18309-2014 (<https://docs.cntd.ru/document/1200115799>).

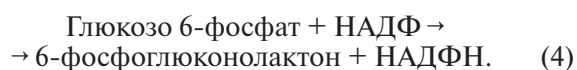
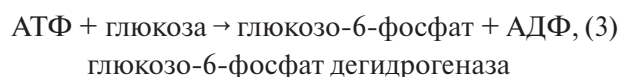
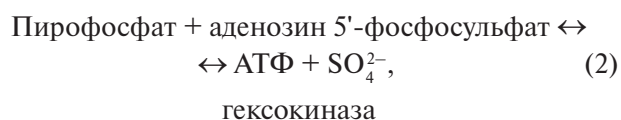
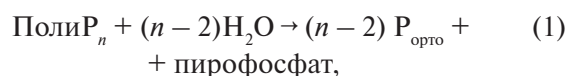
Доступность и простота очистки рекомбинантной Рrx1 из дрожжей позволяет использовать этот метод для анализа разных образцов [83]. Недостатком метода является то, что фермент не гидролизует до Рi образующийся в реакции пирофосфат, что занижает получаемый результат. Этот недостаток устранен в наиболее современном варианте определения полиР с помощью Рrx1, в котором для расщепления образовавшегося пирофосфата добавляется дрожжевая неорганическая пирофосфатаза Ipp1, кодируемая геном *IPP1 (YBR011C)* [84]. Количество полиР выражают в виде количества Рi, образовавшегося в результате полного расщепления полиР.



Оба фермента одновременно добавляют в инкубационную смесь, содержащую Трис-буфер, рН 7.5, соли магния и аммония. Инкубацию с образцами проводят в течение 1 ч при 37°C, а затем к инкубационной смеси добавляют реагент для колориметрического определения Рi [84]. Детальное описание проведения анализа и хранения ферментных препаратов даны в работе [84]. Чувствительность метода зависит от объема инкубационной смеси, который может быть снижен до 100 мкл при использовании планшетного фотометра и зависит от колориметрического метода. Так, при использовании метода определения Рi с малахитовым зеленым чувствительность находится в пределах 1–10 нмоль Рi на образец [82]. Если в образце присутствуют нуклеиновые кислоты, то их необходимо либо удалять из экстрактов, либо увеличивать количество фермента, поскольку они ингибируют активность Рrx1 [37].

С помощью этих двух ферментов можно также определить среднюю длину цепи полиР [51]. К одному образцу добавляют Рrx1, при этом образуются Рi и пирофосфат, а ко второму – одновременно оба

фермента, в результате образуется только Рi. Если вычесть из концентрации Рi во втором образце концентрацию Рi, высвобожденного в результате действия только Рrx1 и разделить полученную величину на 2, то получится концентрация пирофосфата. Она соответствует концентрации полиР в виде полимера в образце. Зная концентрацию полимера и концентрацию полученного из него Рi, можно рассчитать среднюю длину цепи. С увеличением длины цепи полиР происходит значительное снижение вклада Рi, образуемого из пирофосфата [51]. Так, на одну молекулу полиР со средней длиной цепи 280 фосфатных остатков образуется менее одного процента Рi из пирофосфата, что не превышает ошибок колориметрических методов. Поэтому данный метод пригоден для определения длины цепи только коротких полиР, а для определения длины цепи более высокополимерных полиР был разработан метод, в котором определение пирофосфата производят независимо от Рi [84, 85]. Этот метод позволяет определить среднюю длину цепи полиР от двух до нескольких сотен фосфатных остатков [84, 85]. Вначале определяют концентрацию полиР в молях Рi на литр, как описано выше. В отдельном образце определяют количество пирофосфата, образуемого в результате воздействия Рrx1. Поскольку высокочувствительных методов определения пирофосфата в присутствии большего количества Рi не имеется, то применяется ферментативное определение пирофосфата, не связанное с Рi. В результате каскада четырех последовательных реакций одна молекула пирофосфата дает одну молекулу НАДФН, что соответствует одной цепи полиР. Концентрацию НАДФН определяют флуориметрически [38, 84].



В результате этого анализа кроме данных о концентрации полиР, выраженной в молях Рi на литр, получают данные о концентрации самого полимера в молях на литр. Длину цепи рассчитывают путем деления концентрации полиР, выраженной в виде Рi на концентрацию полиР в виде полимера. Метод

позволяет измерять данный параметр количественно вплоть до микромолярных концентраций [84]. Набор перечисленных ферментов для определения средней длины цепи выпускается коммерчески (<https://www.aminoverse.com/phosfinitly/>).

Сравнительный анализ определения средней длины цепи химически полученных линейных полиР в диапазоне средней длины цепи от 2 до 280 фосфатных остатков, проведенный ферментативным и ³¹Р-ЯМР методами показал лишь небольшую разницу от -6 до +8% [84, 85]. Это свидетельствует в пользу точности ферментативного анализа длины цепи, который обладает более высокой чувствительностью и пропускной способностью, а также более дешев по сравнению с ³¹Р-ЯМР-спектроскопией.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). ПолиР, извлеченные из биологического объекта представляют собой гетерогенную смесь молекул различающихся зарядом и молекулярной массой. Электрофорез полиР проводят в геле с концентрацией акриламида от 20 до 30% в присутствии 7 М мочевины. Иногда для разделения полиР в несколько сот фосфатных остатков используют более низкие концентрации акриламида [40]. После электрофореза гели окрашивают либо толуидиновым синим, который дает пурпурное или синее окрашивание полиР [68], либо флуоресцентным красителем DAPI в случае низкого содержания полиР [38, 86, 87]. После окраски полиР на геле

выглядят как удлиненное пятно, которое образуют длинноцепочечные полимеры или как дискретные полосы в случае полимеров с более короткими цепями. При сравнении с подвижностью синтетических полиР с известной средней длиной цепи в качестве маркеров может быть оценена средняя длина цепи полиР образца [68]. В качестве метчиков также используют коммерчески доступные фрагменты ДНК известной длины [88].

Среднюю длину цепи полиР маркеров определяют независимыми методами, обычно с помощью титрования концевых групп или ³¹Р-ЯМР. ПААГ используют не только для идентификации полиР, но, в первую очередь, для сравнительной характеристики распределения полиР с разной длиной цепи. Пример такой электрофореграммы для фракций полиР, полученных из двух видов дрожжей представлен на рис. 2. Здесь хорошо видно, что фракции полиР, получаемые с помощью дробной экстракции, различаются по средней длине цепи.

Гель с полиР после окраски можно сканировать и анализировать с помощью программы для анализа изображений [86]. При помощи электрофореза установить точный размер средней длины цепей фракций полиР невозможно. Метод удобен при сравнении этого параметра у различных штаммов, их мутантов, в случае изучения влияния разнообразных факторов на штаммы.

³¹Р-ЯМР-спектроскопия. Метод ³¹Р-ЯМР-спектроскопии позволяет идентифицировать и коли-

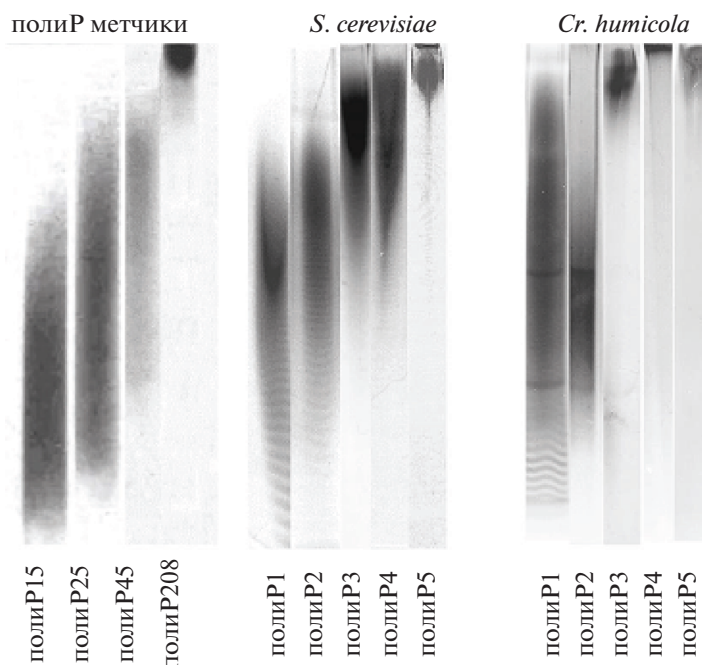


Рис. 2. Электрофореграмма полиР, экстрагированных из клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Cryptococcus humicola*: полиР метчики – коммерческие полиР со средней длиной цепи 15 (полиР15), 25 (полиР25), 45 (полиР45) и 208 (полиР208) фосфатных остатков. Поли1 – полиР5 – фракции полиР, полученные из клеток дрожжей путем многостадийной экстракции (см. “Методы экстракции”).

чественно определить в клетке все соединения, содержащие фосфор, в том числе и полиР. ^{31}P -ЯМР-спектроскопия имеет долгую историю применения как наименее повреждающий и наиболее точный анализ полиР [89–91]. Метод дает информацию о структуре полиР (линейная, циклическая или разветвленная), его общем количестве и средней длине цепи [38]. Линейные полиР дают три резонансных пика: от терминальных фосфатных групп (PP1) – 6.62–7 ppm, от предтерминальных фосфатных групп (PP2–PP3) – 20.17–21.7 ppm, и от внутренних или коровых фосфатных групп (PP4) – 22.37–22.5 ppm [89, 90]. Свойства растворителя образца (рН, температура) влияют на химический сдвиг ^{31}P [38]. С помощью данного метода можно решать следующие задачи: идентифицировать полиР в экстрактах, точно определять среднюю длину цепи полимеров, а также проводить наблюдения в реальном времени за динамикой накопления и деградации внутриклеточных полиР непосредственно в живой клетке [38, 92]. Так, с помощью данного метода в целых клетках бактерии *Xanthobacter autotrophicus* были обнаружены не только линейные полиР, но и в значительном количестве циклические фосфаты с числом фосфатных остатков 3–8 в составе электроноплотных нерастворимых гранул [93], хотя ранее считалось, что в живых организмах циклические фосфаты не присутствуют [3].

По интенсивности пиков, специфических для полиР, можно рассчитать не только количество полиР, но и среднюю длину цепи \bar{n} . Для расчета предложена формула, основанная на соотношении интенсивности пиков коровых (PP4) и терминальных и предтерминальных (PP1, PP2 и PP3) фосфатных групп в ^{31}P -ЯМР спектрах [94]:

$$\bar{n} = 2 ([PP1] + [PP2] + [PP3] + [PP4])/[PP1].$$

При более детальном исследовании было установлено, что интенсивность сигнала коровых фосфатных групп каждого отдельного полиР возрастает пропорционально его концентрации [95]. Чем выше полимерность индивидуального полиР, тем меньше с увеличением его концентрации становится прирост интенсивности пика внутренних фосфатных групп. В связи с этим в данной работе [95] представлена формула для расчета длины цепи полиР с учетом указанного эффекта.

Определение длины цепи полиР в экстрактах из биологических объектов является важной задачей, поскольку длина цепи этих полимеров зависит как от локализации в клетке, так и от ее метаболического состояния [5, 6, 8]. Именно применение ^{31}P -ЯМР-спектроскопии позволило доказать, что пять фракций, выделенных из дрожжей *S. cerevisiae* по методу Лангена и Лисса в модификации Кулаева [57] четко различаются по средней длине цепи, как правило, увеличиваясь от полиР1 до полиР5 [45, 58, 59]. При этом были получены доказатель-

ства, что эта средняя длина цепи изменялась в зависимости от стадии роста и концентрации фосфата в среде [45, 59].

^{31}P -ЯМР-спектроскопия имеет давнюю историю применения для изучения метаболизма полиР в интактных клетках [96]. ПолиР, которые выявляются с помощью ^{31}P -ЯМР, в литературе иногда обозначают как “ЯМР-видимые” (NRM-visible) [97]. Однако отсутствие характерных сигналов не может служить доказательством отсутствия полиР, так как эти сигналы зависят от рН, концентрации двухвалентных катионов и других компонентов клетки, а также от локализации полиР [94]. У некоторых организмов сигналы полиР в ЯМР спектрах появляются только после обработки клеток сильной щелочью [98].

Дополнительные возможности дает метод двумерной диффузионно-упорядоченной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (Diffusion-Ordered Two Dimensional NMR Spectroscopy, 2D- ^{31}P -DOSY-ЯМР), с помощью которого можно определять индивидуальные длины цепей молекул полиР, присутствующих в смеси [38, 87, 99, 100]. ^{31}P -DOSY-ЯМР связывает химический сдвиг полиР с коэффициентом диффузии для каждого компонента смеси. Коэффициент диффузии обратно пропорционален молекулярной массе [38, 99]. Для оценки молекулярной массы индивидуальных полиР (длины цепи) на основе значений их диффузии обычно строят калибровочную кривую корреляции между логарифмами значения диффузии идентифицированных сигналов и их теоретической молекулярной массой. В случае полиР для построения линии регрессии подходят идентифицированные сигналы орто-, пиро- и триполифосфатов. Используя уравнение для полученной кривой, были математически рассчитаны значения молекулярных масс полифосфатов смеси из соответствующих значений их диффузии. Разница между определенной (измеренной) и теоретической молекулярной массой индивидуальных компонентов смеси составляла до 7.3%, что ниже 10% предела точности для экспериментов DOSY [99]. Таким образом, использование ^{31}P -DOSY-ЯМР-спектроскопии расширяет возможности ЯМР-спектроскопии в оценке гетерогенности полиР и длины цепей хорошо разрешенных сигналов полиР. Однако метод применяется для полиР достаточно редко в силу дороговизны приборного обеспечения. Кроме того, клеточные системы метаболизма длинноцепочечных полиР обычно не реагируют на разницу между этими молекулами от одного до нескольких фосфатных остатков. Что касается короткоцепочечных полиР и пирофосфата, то для их анализа существуют более дешевые и простые, в частности, энзиматические методы.

Основным недостатком метода ^{31}P -ЯМР-спектроскопии является дорогое оборудование и необходимость большого количества полиР в образцах. Поэтому метод наиболее пригоден для химически синтезированных полиР, а также для живых клеток с большим содержанием полиР. Данный метод в силу высокой точности и надежности идентификации фосфорных соединений остается необходимым этапом при доказательстве присутствия полиР в новых, неисследованных ранее объектах [101]. Этот метод часто применяется при исследовании полиР в активированных илах, почвах и природных водах, в первую очередь тех, где присутствуют так называемые РАО (Phosphate accumulating organism, фосфат-аккумулирующие микроорганизмы) [102], а также при анализе разнообразных условий протекания процесса EBPR (усовершенствованное удаление фосфата). Литература по применению ^{31}P -ЯМР-спектроскопии для изучения EBPR многочисленна и здесь приведены лишь несколько примеров [103–105]. ^{31}P -ЯМР по-прежнему считается так называемым золотым стандартом для анализа полиР и при необходимости используется даже в случае небольшого содержания полиР, в том числе для клеток человека [106].

Электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDX), рамановская микроскопия. При электронной микроскопии тонких срезов, окрашенных солями свинца, скопления фосфорных соединений выглядят электроноплотными образованиями, что позволяет выявлять гранулы полиР и их локализацию в клетке (рис. 3). Такие микрофотографии клеток микроорганизмов можно найти во многих публикациях, в частности, множественная локализация полиР в клетках дрож-

жей хорошо продемонстрирована именно таким образом в работе [107]. Для однозначной идентификации фосфора (и других элементов) на тонких срезах или сколах после замораживания применяется энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX), которая позволяет получить также и количественные данные по содержанию различных элементов. С помощью этого метода, находящегося в арсенале исследователей уже более полувека, определили не только локализацию гранул полиР, но и наличие в этих гранулах катионов Na, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Ba, и Al. Метод особенно ценен тем, что позволяет определить состав катионов в гранулах полиР, он был успешно применен для идентификации полиР и локализации гранул полиР в клетках различных организмов и в настоящее время используется столь широко, что ниже мы приведем только несколько ссылок в качестве примера. В данных работах приводятся как количественные данные, так и микрофотографии, позволяющие видеть особенности локализации полиР и влияние физиологических условий на эту локализацию, в том числе для клеток бактерий [108–113], грибов [114–116], водорослей [117], трипаносом [118]. Методом EDX показана локализация гранул полиР в костной ткани [9] и синовиальной жидкости млекопитающих [119].

Строго говоря, данные EDX свидетельствуют о наличии фосфора, а не собственно полиР. Однако случаи накопления других фосфорных соединений в клетках встречаются относительно редко, так у бактерии *Desulfovibrio gigas* электроноплотные гранулы содержали β -глюкозу, 1,2,3,4,6- пентафосфат [120], а у *Brevibacterium antiquum* накапливался

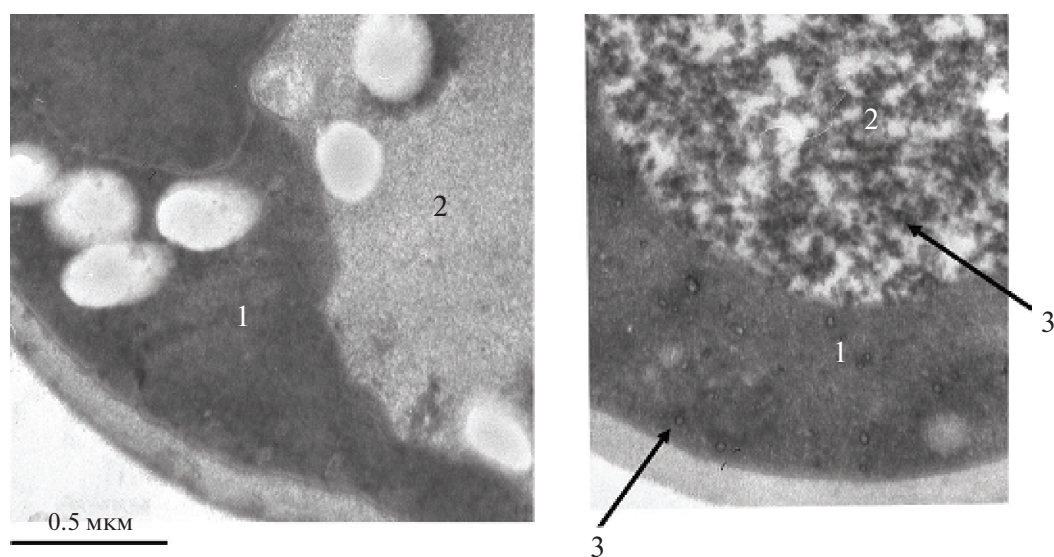


Рис. 3. Электронно-микроскопическая фотография тонких срезов клеток *S. cerevisiae*, контрастирование солями свинца: а – клетки, выращенные при лимите фосфата; б – клетки, выращенные при избытке фосфата; 1 – цитоплазма, 2 – вакуоль, 3 – гранулы, содержащие фосфор. Фотография выполнена Н.Е. Сузиной.

ортофосфат магния [50]. Кроме того, наличие полиР может быть подтверждено другими методами и в сочетании с EDX это позволяет получить надежные количественные данные о локализации этого полимера в клетке.

Еще одним методом, применяемым для идентификации полиР, является рамановская спектроскопия в качестве неинвазивного метода для оценки динамики внутриклеточного полиР. Этот метод был успешно применен для полифосфат-аккумулирующих микроорганизмов в процессах усиленного биологического удаления фосфора, где дифференциальные спектры комбинационного рассеяния полиР позволили как идентифицировать ПАО, так и количественно оценить распределение внутриклеточных полиР во время различных метаболических фаз [121]. Метод также использован в исследовании одноклеточных водорослей [122].

Анализ с помощью флуоресцентных красителей. Чувствительным и относительно специфичным способом обнаружения полиР *in situ* является флуоресцентная микроскопия с использованием красителя 4',6'-диамино-2-фенилиндола·2HCl (DAPI), который обычно применяется для обнаружения ДНК. При высокой концентрации (50 мг/мл) он окрашивает гранулы полиР и липидные включения [123–125]. Флуоресценция комплексов DAPI-ДНК бело-голубая, DAPI-полиР, DAPI-липидных комплексов и DAPI-полигидроксибутиратных комплексов – желтая. Флуоресценция последних слабая и через некоторое время наблюдения угасает, тогда как гранулы, содержащие полиР, флуоресцируют ярко-желтым, что позволяет различить эти включения [125]. Длина волны возбуждения DAPI составляет 330–385 нм, а испускания – 456 нм, в то время как полиР вызывают сдвиг максимума флуоресценции до 525 нм. При длине цепи меньшей, чем 15, уровень флуоресценции снижается [126].

Окрашивание DAPI является простым способом визуализации гранул полиР *in vivo* как в клетках микроорганизмов, так и в клетках млекопитающих. Работы, где используется это окрашивание, многочисленны, и ниже мы приведем лишь некоторые из них. Это окрашивание использовали для идентификации полиР в вакуолях [123] и на поверхности клеток дрожжей [124]. На рис. 4 в качестве примера показана микрофотография клеток дрожжей *Cryptococcus humicola*, окрашенных DAPI. Светлые гранулы на рис. 4 – оранжевая флуоресценция при указанных выше параметрах флуоресцентной микроскопии. Возможность прижизненного окрашивания позволяет с помощью DAPI наблюдать за движением гранул полиР в бактериальной клетке [127] или в вакуолях дрожжей [128], что представляет интерес при сравнительном анализе роли полиР в разных физиологических условиях. Описаны протоколы окрашивания этим флуорохромом клеток трипаносом, одноклеточ-

ной водоросли *Euglena gracilis* и насекомых [129]. Для обнаружения полиР в бактериальных клетках и в клетках млекопитающих использовали также проточную цитофлуориметрию клеток, окрашенных DAPI. Этот подход позволяет получать сравнительные количественные данные об относительных уровнях полиР [36]. Спектры флуоресценции комплексов синтетических полиР при разном соотношении полиР и DAPI, отсутствие влияния на них АТФ и анализ влияния ДНК, а также методика количественного определения полиР в биологических образцах представлены в работе [130]. Здесь же указана чувствительность метода – 25 нг/мл при использовании в качестве стандарта полиР со средней длиной цепи 70 фосфатных остатков [130].

Идентификация полиР накапливаемых микроорганизмами в илах и других природных объектах необходима как для мониторинга гомеостаза фосфора в этих экологических нишах, так и для разработки микробных консорциумов, обеспечивающих удаление фосфата из стоков. Окраску DAPI используют также для идентификации полиР-накапливающих микроорганизмов в активированных илах [36, 131, 132], или в составе планктона [133]. Разработан метод изоляции полифосфат-аккумулирующих организмов (PAOs) из илов и других природных образцов [134]. Образцы окрашивали DAPI (10 мкг/мл) в течение 30 мин, при этом происходила визуализация гранул полиР и сохранение жизнеспособности около 60% клеток. Клетки, накапливающие полиР, выделяли с помощью варианта метода проточной цитофлуориметрии FACS (Fluorescence-activated cell sorting). Их затем использовали для микробиологических тестов и определения их систематического положения с помощью секвенирования гена 16S рРНК [134].

Другие методики количественного анализа содержания полиР с помощью DAPI в различных

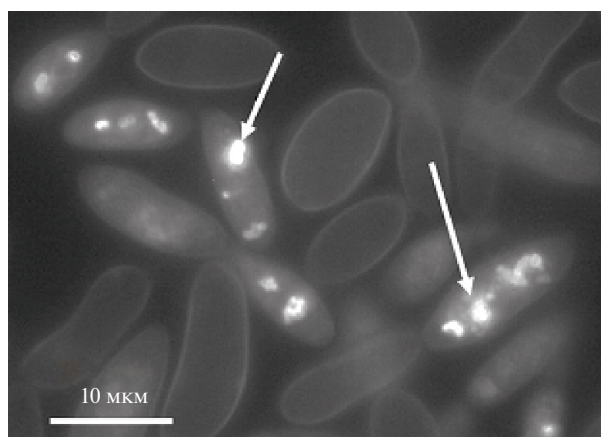


Рис. 4. Флуоресцентная микрофотография клеток дрожжей *Cryptococcus humicola*, окраска DAPI, стрелки указывают гранулы полиР, окрашенные DAPI. Фотография выполнена А.Н. Звонаревым.

биологических образцах рассмотрены в обзоре [36], а детальные протоколы количественного анализа полиР в экстрактах приведены в ряде статей [126, 129, 133, 135]. Возможность количественной оценки содержания полиР подтверждена с помощью анализа на содержание фосфора методом EDX, а также энзиматическим методом анализа в экстрактах [129]. Чувствительность метода зависит от используемого варианта флуориметрии, она может быть повышена при использовании малых объемов, в том числе при измерении в планшетных фотометрах. Сообщалось о чувствительности метода в пределах 0,2–7,0 нмоль полиР в пробе (считая по количеству ортофосфата) [133]. Отмечено, что в связи с разницей в максимумах интенсивности флуоресценции между DAPI-полиР и DAPI-ДНК, DAPI-АТФ, присутствие в экстрактах ДНК или нуклеотидов не приводит к значимому завышению результатов, тогда как присутствие РНК может вносить более существенный вклад в уровень флуоресценции, поскольку комплексы DAPI-РНК имеют максимум флуоресценции в зеленой области спектра [129, 133]. Способность DAPI образовывать комплексы с РНК, флуоресцирующие зеленым была известна ранее [136]. Предлагается для повышения достоверности результатов удалять РНК из экстрактов с помощью РНКаз [129, 133]. Более простой способ удаления из экстрактов как нуклеиновых кислот, так и нуклеотидов состоит в предварительной инкубации их с активированным углем, который сорбирует органические вещества, но не полиР [55, 70].

В связи с тем, что в клетках и тканях млекопитающих содержится относительно небольшое количество полиР, идентификация их с DAPI является широко применяемым подходом. В работе [9] описана подготовка образцов, спектральный анализ и результаты, полученные на образцах костной ткани, которые также подтверждены EDX и предобработкой щелочной фосфатазой. Имеется детальное описание флуоресцентного анализа полиР с использованием различных методов фиксации клеток и контрольной предобработкой щелочной фосфатазой в тромбоцитах [137] в том числе количественного анализа [138]. Флуоресценция с DAPI была использована для определения полиР в отдельных органеллах клеток млекопитающих: митохондриях [139, 140] и ядрах [42]. Обзор, включающий описание анализа полиР у млекопитающих также уделяет внимание данному методу [39].

В некоторых работах в качестве флуорохрома используется тетрациклин [38] (с длиной волны возбуждения 390 нм и длиной волны излучения 515 нм), однако этот метод не получил большого распространения из-за того, что антибиотик дает зеленую флуоресценцию также с ионами магния и кальция [141].

Чтобы повысить специфичность анализа, разрабатывается применение других флуоресцентных зондов. Так, флуорохром JC-D7 более специфичен по сравнению с DAPI и не окрашивал РНК, что позволило обнаружить высвобождения полиР из лизосом в живых клетках в реальном времени и повышение уровня полиР в клетках с мутациями, связанными с болезнью Паркинсона [142]. Этот краситель использовали также для количественного анализа полиР в экстрактах из клеток бактерий и водорослей [143]. Раствор JC-D7 в диметисульфоксиде (DMSO) в концентрации 1 мМ разводили в 25 мМ Hepes, pH 8.0 до концентрации 60 μ M и добавляли к экстрактам в соотношении 1 : 1. Окрашивание происходило в течение 5–10 мин и интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны возбуждения и эмиссии 405 и 535 нм соответственно. Чувствительность метода составила от 5 до 30 мкM полиР (по фосфату) для полимеров с длинами цепи от 15 до 130 фосфатных остатков. Авторы сравнили энзиматический метод количественного определения полиР с полифосфатазами Ppx1 и Ipp1 и флуоресцентные методы с DAPI и JC-D7. DAPI давал несколько завышенный результат, если не проводить предварительный гидролиз ДНК и РНК в образцах, тогда как данные с новым красителем были близки к полученным с помощью энзиматического метода без дополнительной обработки [143]. Метод окрашивания JC-D7 был использован для оценки содержания полиР в экстрактах из клеток дрожжей. Показано, что флуоресцентный отклик зависел от концентрации полиР в диапазоне концентраций полиР 0,5–500 мкг/мл, но он также зависел от длины цепи полимера, что снижало возможность абсолютной количественной оценки. Флуоресценция JC-D7 не зависела от неорганического фосфата до 50 мМ, но зависела от присутствия ионов металлов [144].

В целом, флуоресцентные методы остаются основными для прижизненного наблюдения за локализацией полиР, а также для быстрого и чувствительного количественного анализа в образцах разного происхождения, в первую очередь тех, где содержание полиР невелико. Основной проблемой, которая возникает при анализе результатов, полученных при окрашивании DAPI, является способность этого флуорохрома давать сдвиг в красную область спектра при взаимодействии с РНК [136], гепарином [145], инозитол-фосфатами [146] и аморфным фосфатом кальция [147]. В связи с этим сохраняется необходимость подтверждения полученных результатов с помощью EDX и энзиматического метода, а также использования ДНКаз и РНКаз при предобработке экстрактов для последующего количественного определения.

В заключение отметим, что выбор методов исследования полиР в биологических объектах зависит от задач и объекта исследования. В литературе описаны относительно редко применяемые методы, которые могут быть полезны для решения специфических задач. Это капиллярный электрофорез [148], масс-спектрометрия, которые применимы для короткоцепочечных полиР [149], а также методы, основанные на применении полиР-зависимых белков и антител к ним [150]. Современные методы дают возможности для анализа полиР как в живых клетках, так и в различных экстрактах из биологического материала, позволяют отслеживать динамику накопления и расходования полиР при изменении внешних условий, изучать локализацию этих соединений и получать данные об их количественном содержании и особенностях строения с высокой точностью и надежностью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проведение работы не поддерживалось внешними источниками.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harold F.M. // *Bacteriol. Rev.* 1966. V. 30. № 4. P. 772–794. <https://doi.org/10.1128/br.30.4.772-794.1966>
2. Kornberg A. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 491–496.
3. Кулаев И.С. // *Биохимия неорганических полифосфатов.* 1975. М: Изд. МГУ. 246 с.
4. Kornberg A., Rao N.N., Ault-Riché D. // *Ann. Rev. Biochem.* 1999. V. 68. P. 89–125.
5. Kulaev I., Vagabov V., Kulakovskaya T. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 88. P. 111–129.
6. Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A. // *Ann. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 605–647.
7. Albi T., Serrano A. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 2. Art. 27 <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1983-2>
8. Clotet J. // *Curr. Genet.* 2017. V. 63. P. 15–18.
9. Omelon S., Georgiou J., Henneman Z.J., Wise L.M., Sukhu B., Hant T., Wynnyckyj S., Holmyard D., Bielecki R., Grynypas M.D. // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. № 5. Art. e5634.
10. Müller W.E., Wang X., Schröder H.C. // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2017. V. 55. P. 187–219.
11. Baker C.J., M.S, Smith S.A., Morrissey J.H. // *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis.* 2019. V. 3. P. 18–25.
12. Huang W.C., Mailer R.K., Renné T. // *Curr. Opin. Hematol.* 2023. V. 30. № 5. P. 159–166. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000771>
13. Seidlmayer L.K., Juettner V.V., Kettlewell S., Pavlov E.V., Blatter L.A., Dedkova E.N. // *Cardiovascular Research.* 2015. V. 106. P. 237–248.
14. Baev A.Y., Negoda A., Abramov A.Y. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2017. V. 49. P. 49–55.
15. Angelova P.R., Iversen K.Z., Teschemacher A.G., Kasparov S., Gourine A.V., Abramov A.Y. // *Glia.* 2018. V. 66. P. 2126–2136.
16. Xie L.; Jakob U. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 6. P. 2180–2190.
17. Yamaguchi K., Nakajima K., Goto Y. // *Biophysics and Physicobiology.* 2023. V. 20. Art. e200013. <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v20.0013>
18. Guan J., Jakob U. // *J. Mol. Biol.* 2024. Art. 168504. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168504>
19. Garcés P., Amaro A., Montecino M. // *Review Biochem. Soc. Trans.* 2024. V. 52 № 1. P. 123–135. <https://doi.org/10.1042/BST20230257>
20. Fujiya M., Ueno N., Kashima S., Tanaka K., Sakatani A., Ando K., Moriichi K., Konishi H., Kamiyama N., Tasaki Y., Omura T., Matsubara K., Taruishi M., Okumura T. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2020. V. 107. № 2. P. 452–461. <https://doi.org/10.1002/cpt.1628>
21. Borghi F., Saiardi A. // *Biochem. Soc. Trans.* 2023. V. 51. № 5. P.1947–1956. <https://doi.org/10.1042/BST20230483>
22. Diaz J., Ingall E., Benitez-Nelson C., Paterson D., de Jonge M.D., McNulty I., Brandes J.A. // *Science.* 2008. V. 320. P. 652–655.
23. Diaz J.M., Steffen R., Sanders J.G., Tang Y. // *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21 № 7. P. 2415–2425. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14630>
24. Zhang C., Guisasola A., Baeza J.A. // *Water Research.* 2022. V. 212. Art. 118102. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118102>
25. Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пуменов Н.В. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. № 1. С. 3–18.
26. Hata Y., Hiruma S., Miyazaki H., Nakamura S. // *ACS Omega.* 2024. V. 9. № 11. P. 12635–12642. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07627>
27. Wang X., Gao Y., Chu G. // *ACS Omega.* 2021. V. 6. № 29. P. 18811–18822. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01999>
28. Zirnstein B., Schulze D., Schartel B. // *Materials (Basel).* 2019. V. 12. № 12. Art.pii: E1932. <https://doi.org/10.3390/ma12121932>
29. Berardi G., Di Taranto A., Haouet N., Vita V., Palomba E., Rizzi G., Iammarino M. // *Ital. J. Food Saf.*

2023. V. 12. № 4. Art. 11110.
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2023.11110>
30. *Malik A., Khan J.M., Al-Amri A.M., Altwaijry N., Sharma P., Alhomida A., Sen P.* // ACS Omega. 2023. V. 8 № 46. P. 44086–44092.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06210>
31. *Müller W.E.G., Neufurth M., Wang S., Schröder H.C., Wang X.* // Int. J. Nanomedicine. 2024. V. 19. P. 1303–1337.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S446405>
32. *Wang X., Schröder H.C., Müller W.E.G.* // J. Mater. Chem. B. 2018. V. 6. № 16. P. 2385–2412.
<https://doi.org/10.1039/c8tb00241j>
33. *Sugai R., Kobayashi M., Niizuma Y., Mizukami H., Koyasu M., Shiba T., Kitahara N., Manabe A* // J. Esthet. Restor. Dent. 2024. V. 36 № 3. P. 484–493.
<https://doi.org/10.1111/jerd.13163>
34. *Müller W.E.G., Neufurth M., Wang S., Schröder H.C., Wang X.* // Small. 2024. Art. e2309528.
<https://doi.org/10.1002/smll.202309528>
35. *Summonte S., Sanchez Armengol E., Ricci F., Sandmeier M., Hock N., Güclü-Tuncyüz A., Bernkop-Schnürch A.* // Int. J. Pharm. 2024. V. 654. Art. 123983.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123983>
36. *Tarayre C., Nguyen H.T., Brognaux A., Delepierre A., De Clercq L., Charlier R., Michels E., Meers E., Delvigne F.* // Sensors (Basel). 2016. V. 16. № 6. Art. 797.
<https://doi.org/10.3390/s16060797>
37. *Bru S., Jiménez J., Canadell D., Ariño J., Clotet J.* // Microb. Cell. 2017. V. 2. № 4(1). P. 6–15.
<https://doi.org/10.15698/mic2017.01.551>
38. *Christ J.J., Willbold S., Blank L.M.* // Anal. Chem. 2020. V. 92. № 6. P. 4167–4176.
39. *Kullik G.A., Waldmann M., Renné T.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2024. V. 90. Art. 103208.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2024.103208>
40. *Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В.* // Высокмолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Изд. Научный мир, 2005. 215 с.
41. *Christ J.J., Blank L.M.* // Anal. Biochem. 2018. V. 563. P. 71–78.
42. *Borghi F., Azevedo C., Johnson E., Burden J.J., Sairardi A.* // Cell Rep. Methods. 2024. V. 4. № 7. Art. 100814.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2024.100814>
43. *Clark J.E., Beegen H., Wood H.D.* // J. Bacteriol. 1986. V. 168. P. 1212–1219.
44. *Langen P., Liss E.* Naturwissenschaften. 1959. V. 46. P. 151–152.
45. *Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Щипанова И.Н., Сибельдина Л.А., Кулаев И.С.* // Микробиология. 1998. Т. 67. № 3. С. 193–198.
46. *Калебина Т.С., Кулаковская Е.В., Рекстина В.В., Трилисенко Л.В., Зиганишин Р.Х., Мармий Н.В., Есипов Д.С., Кулаковская Т.В.* // Биохимия. 2023. Т. 88. № 1. С. 125–135.
47. *Wilson M.S.C., Bulley S.J., Pisani F., Irvine R.F., Sairardi A.* // Open Biol. 2015. V. 5. Art. 150014.
<https://doi.org/10.1098/rsob.150014>
48. *Werner T.P., Amrhein A.E.N., Freimoser F.M.* // Arch. Microbiol. 2005. V. 184. P. 129–136.
<https://doi.org/10.1007/s00203-005-0031-2>
49. *Несмеянова М.А., Дмитриев А., Кулаев И.С.* // Микробиология. 1973. Т. 42. С. 213–219.
50. *Smirnov A., Suzina N., Chudinova N., Kulakovskaya T., Kulaev I.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 52. № 1. P. 129–137.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.012>
51. *Christ J.J., Blank L.M.* // Anal. Biochem. 2018. V. 548. P. 82–90.
52. *Эльдаров М.А., Баранов М.В., Думина М.В., Жгун А.А., Андреева Н.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Т.В., Рязанова Л.П., Кулаев И.С.* // Биохимия. 2013. Т. 78. № 8. С. 1201–1209.
53. *Ledova L.A., Ryazanova L.P., Kulakovskaya T.V.* // Microbiology. 2024. V. 93. P. 610–614.
54. *Ault-Riché D., Fraley C.D., Tzeng C.-M., Kornberg A.* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 7. P. 1841–1847.
55. *Tomashevsky A., Kulakovskaya E., Trilisenko L., Kulakovskiy I., Kulakovskaya T., Fedorov A., Eldarov M.* // Biology. 2021. V. 10. Art. 487.
<https://doi.org/10.3390/biology10060487>
56. *Labberton L., Kenne E., Long A.T., Nickel K.F., Di Gennaro A., Rigg R.A., Hernandez J.S., Butler L., Maas C., Stavrou E.X.* // Nat. Commun. 2016. V. 7. Art. 12616.
57. *Кулаев И.С., Крашенинников И.А., Кокурина И.А.* // Биохимия. 1966. Т. 31. С. 850–858.
58. *Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S.* // FEMS Yeast Res. 2008. V. 8. P. 877–882.
59. *Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаев И.С.* // Биохимия. 2000. Т. 65. № 3. С. 414–420.
60. *Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С.* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 5. С. 611–616.
61. *Andreeva N., Ryazanova L., Dmitriev V., Kulakovskaya T., Kulaev I.* // FEMS Yeast Res. 2013. V. 13. P. 463–470.
62. *Трилисенко Л.В., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Кулаковская Е.В., Томашевский А.А., Кулаковская Т.В.* // Biologia et Biotechnologia. 2024. V. 1. Art. 4.
<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.4>
63. *Eixler S., Selig U., Karsten U.* // Hydrobiologia. 2005. V. 533. P. 135–143.
<https://doi.org/10.1007/s10750-004-2406-9>
64. *Thilo E., Wieker W.* // Z. Anorg. Allg. Chem. 1957. V. 291. P. 164–1854.
65. *Ebel J.P., Colas J., Muller S.* // Exp. Cell. Res. 1958. V. 15. P. 36–42.
66. *Baluyot E.S., Hartford C.G.* // J. Chromatography A. 1996. V. 739. P. 217–222.

67. *Andreeva N.A., Okorokov L.A.* // *Yeast*. 1993. V. 9. P. 127–139.
68. *Kumble K.D., Kornberg A.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 11. P. 5818–5822.
69. *Bock R.M.* // *Controlled partial hydrolysis of RNA. Methods in Enzymology*. 1967. V. 12. Part A. P. 218–221.
70. *Чернышева Е.К., Крицкий М.С., Кулаев И.С.* // *Биохимия*. 1971. Т. 36. № 1. С. 138–142.
71. *Segawa S., Fujiya M., Konishi H., Ueno N., Kobayashi N., Shigyo T., Kohgo Y.* // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 8. Art. e23278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023278>
72. *Anand A., Aoyagi H.* // *Sci Rep*. 2019. V. 9. Art. 4879. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37752-8>
73. *Corbridge D.E.C.* // *Phosphorus. An Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology (Second edition)* Elsevier Sci. Pub. Comp. Amsterdam-Oxford-New York. 1980.
74. *Соколов И.А., Мурын И.В., Круйт В.Е., Горяинова А.Я., Пронкин А.А.* // *Вестник Санкт-Петербургского Университета*. 2012. Сер. 4. Вып. 4. С. 54–74.
75. *Robinson T.E., Arkinstall L.A., Cox S.C., Grover L.M.* // *Comments on Inorganic Chemistry*. 2022. V. 42. № 1. P. 47–59. <https://doi.org/10.1080/02603594.2021.1973444>
76. *Becke-Goehring M.* // *Phosphorus and its Compounds, Bd. 1: Chemistry, first ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany*, 1961.
77. *Ruiz F.A., Rodroques C.O., Docampo R.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 26114–26121.
78. *Ohtomo R., Sekiguchi Y., Kojima T., Saito M.* // *Anal. Biochem.* 2008. V. 383. P. 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.08.002>
79. *Heinonen Y.K., Lahti R.Y.* // *Anal. Biochem.* 1981. V. 113. P.313–317.
80. *Kulakovskaya T.V., Andreeva N.A., Karpov A., Sidorov I., Kulaev I.S.* // *Biochemistry (Moscow)* 1999. V. 64. P. 990–993.
81. *Van Veldhoven P.P., Mannaerts G.P.* // *Anal. Biochem.* 1987. V. 161. P. 45–48.
82. *Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M.* // *Biochimie*. 2019. V. 163. P. 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.001>
83. *Lichko L., Kulakovskaya T.* // *Adv. Enzym. Res.* 2015. V. 3. P. 93–100. <https://doi.org/10.4236/aer.2015.34010>
84. *Christ J.J., Willbold S., Blank L.M.* // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 12. P. 7654–7661.
85. *Christ J.J.* // *Aminoverse*. 2023. Homepage for the Phosfinty ChainQuant Assay <https://www.amino-verse.com/enzyme-products/phosfinty-chainquant/>.
86. *Smith S.A., Morrissey J.H.* // *Electrophoresis* 2007. V. 28. № 19. P. 3461–3465. <https://doi.org/10.1002/elps.200700041>
87. *Manoukian L., Stein R.S., Correa J.A., Frigon D., Omelon S.* // *Electrophoresis*. 2023. V. 44. P. 1197–1205. <https://doi.org/10.1002/elps.202300055>
88. *Smith S.A., Yan Wang, Morrissey J.H.* // *Electrophoresis*. 2018. V. 39. № 19. P. 2454–2459. <https://doi.org/10.1002/elps.201800227>
89. *Glohek T., Lunde M., Mudgett M., Myers T.C.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 142. P. 508–513.
90. *Ugurbil L., Rottenberg H., Glynn R., Schulman G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. P. 2224–2228.
91. *Островский Д.Н., Сенетов Н.Ф., Решетняк В.И., Сибельдина Л.А.* // *Биохимия*. 1980. Т. 45. С. 517–525.
92. *Lambert C., Weuster-Botz D., Weichenhain R., Kreutz E.W., de Graaf A.A., Schoberth S.M.* // *Acta Biotechnol.* 2002. V. 22. P. 245–260.
93. *Mandala V.S., Loh D.M., Shepard S.M., Geeson M.B., Sergeev I.V., Nocera D.G. Cummins C.C., Hong M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142. № 43. P. 18407–18421. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c06335>
94. *Pilatus U., Mayer, Hildebrandt.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. V. 275. P. 215–223.
95. *Крупяно В.И., Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Крупяно П.В., Шипанова И.Н., Сибельдина Л.А., Кулаев И.С.* // *Прикл. биохим. микробиол.* 1998. Т. 34. С. 430–434.
96. *Chen K.Y.* // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1999. V. 23. P. 253–273. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58444-2_13
97. *Loureiro-Dias M.C., Santos H.* // *Arch. Microbiol.* 1990. V. 153. P. 384–391.
98. *Pereira H., Lemos P.C., Carrondo M.J.T., Crespo J.P.S., Peis M.A.M., Santos H.* // *Water Res.* 1996. V. 30. P. 2128–2138.
99. *Wang L., Kuchendorf C., Willbold S.* // *Algal Res.* 2019. V. 43. Art. 101631. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101631>
100. *Viéville J., Tanty M., Delsuc M.-A.* // *J. Magn. Reson.* 2011. V. 212. P. 169–173.
101. *Lyratzakis A., Kalogerakis M., Polymerou K., Spyros A., Tsiotis G.* // *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 2024. V. 1868. № 12. Art. 130718. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2024.130718>
102. *Kooij J., Yang P.T., Bruun S., Magid J., Gro Nielsen U., Theil Kuhn L., Müller-Stöver D.* // *J. Environ. Manage.* 2024. V. 370. Art. 122565. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.122565>
103. *Bahgat N.T., Wilfert P., Eustace S.J., Korving L., van Loosdrecht M.C.M.* 2024. V. 262. P. 122077. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024>

104. *Duersch B.G., Luo Y., Chen S., Soini S.A., Raja Somu D.M., Merk V.M.* // *Environ. Pollut.* 2023. V. 334. Art. 121781.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121781>
105. *Petriglieri F., Petersen J.F., Peces M., Nierychlo M., Hansen K., Baastrand C.E., Nielsen U.G., Reitzel K., Nielsen P.H.* // *Environ. Sci. Technol.* 2022. V. 56. № 8. P. 5132–5140.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02642>
106. *Lázaro B., Sarrias A., Tadeo F.J., Marc Martínez-Láinez J., Fernández A., Quandt E., Depares B., Dürr-Mayer T., Jessen H., Jiménez J., Clotet J., Bru S.* // *Methods.* 2025. V. 234. P. 211–222.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2025.01.001>
107. *Voříšek J., Knotková A., Kotyk A.* // *Zbl. Mikrobiol.* 1982. V. 137. P. 421–432.
108. *Jensen T.E.* // *Arch. Microbiol.* 1968. V. 62. P. 144–152.
109. *Schonborn C., Bauer H.D., Roske L.* // *Water. Res.* 2001. V. 35. P. 3190–3196.
110. *Ward S.K., Heintz J.A., Albrecht R.M., Talaat A.M.* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012. V. 2. Art. 63.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00063>
111. *Tocheva E.I., Dekas A.E., McGlynn S.E., Morris D., Orphan V.J., Jensen G.J.* // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. № 17. P. 3940–3946.
<https://doi.org/10.1128/JB.00712-13>
112. *Racki L.R., Tocheva E.I., Dieterle M.G., Sullivan M.C., Jensen G.J., Newman D.K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2017. V. 114. № 12. E2440–E2449.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1615575114>
113. *Janet-Maitre M., Pont S., Masson F.M., Sleiman S., Trouillon J., Robert-Genthon M. et al.* // *PLoS Pathog.* 2023. V. 19. № 1. Art. e1011023.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011023>
114. *Ashford A.E., Ling-Lee M., Chilvers G.A.* // *New. Phytol.* 1975. V. 74. P. 477–453.
115. *Orlovich D.A., Ashford A.E.* // *Protoplasma.* 1993. V. 173. P. 91–102.
116. *Bucking H., Beckmann S., Heyser W., Kottke I.* // *Micron.* 1998. V. 29. P. 53–61.
117. *Sanz-Luque E., Bhaya D., Grossman A.R.* // *Front. Plant. Sci.* 2020. V. 11. P. 938.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00938>
118. *Docampo R.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2024. V. 88. № 1. Art. e0004223.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.00042-23>
119. *Wang X., Ackermann M., Tolba E., Neufurth M., Wurm F., Feng Q. et al.* // *Eur. Cell Mater.* 2016. V. 32. P. 271–283.
<https://doi.org/10.22203/eCM.v032a18>
120. *Hensgens C.M., Santos H., Zhang C., Kruizinga W.H., Hansen T.A.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 242. P. 327–331.
121. *Majed N., Matthäus C., Diem M., Gu A.Z.* // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43. № 14. P. 5436–5442.
<https://doi.org/10.1021/es900251n>
122. *Moudříková Š., Ivanov I.N., Vítová M., Nedbal L., Zachleder V., Mojžeš P., Bišová K.* // *Cells.* 2021. V. 10. Art. 62.
<https://doi.org/10.3390/cells10010062>
123. *Allan R.A., Miller J.J.* // *Can. J. Microbiol.* 1980. V. 26. P. 912–920.
124. *Tijssen J.P.F., Beekes H.W., Van Steveninck J.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1982. V. 721 P. 394–398.
125. *Streichan M., Golecki J.R., Schon G.* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1990. V. 73. P. 113–124.
126. *Kulakova A.N., Hobbs D., Smithen M., Pavlov E., Gilbert J.A., Quinn J.P., McGrath J.W.* // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. № 18. P. 7799–7803.
<https://doi.org/10.1021/es201123r>
127. *Frank C., Pfeiffer D., Aktas M., Jendrosseck D.* // *Microb. Physiol.* 2022. V. 32. № 3–4. P. 71–82.
<https://doi.org/10.1159/000521970>
128. *Puchkov E.O.* // *Yeast.* 2010. V. 27. № 6. P. 309–315.
<https://doi.org/10.1002/yea.1754>
129. *Gomes F.M., Ramos I.B., Wendt C., Girard-Dias W., De Souza W., Machado E.A., Miranda K.* // *Eur. J. Histochem.* 2013. V. 57. № 4. Art. e34.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2013.e34>
130. *Aschar-Sobbi R., Abramov A.Y., Diao C., Kargacin M.E., Kargacin G.J., French R.J., Pavlov E.* // *J. Fluoresc.* 2008. V. 18. № 5. P. 859–866.
<https://doi.org/10.1007/s10895-008-0315-4>
131. *Serafim L.S., Lemos O.C., Levantesi C., Tandoi V., Santos H., Reis M.A.* // *J. Microbiol. Methods.* 2002. V. 51. P. 1–18.
132. *Liu W.T., Nielsen A.T., Wu J.H., Tsai C.S., Matsuo Y., Molin S.* // *Environ. Microbiol.* 2001. V. 3. № 2. P. 110–122.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00164.x>
133. *Martin P., Van Mooy B.A.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 1. P. 273–281.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02592-12>
134. *Terashima M., Kamagata Y., Kato S.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 793.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00793>
135. *Diaz J.M., Ingall E.D.* // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 4665–4671.
<https://doi.org/10.1021/es100191h>
136. *Tanious F.A., Veal J.M., Buczak H., Ratmeyer L.S., Wilson W.D.* // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 3103–3112.
137. *Sato A., Aizawa H., Tsujino T., Isobe K., Watanabe T., Kitamura Y., Kawase T.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 3. Art. 1040.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031040>
138. *Kawase T., Suzuki K., Kamimura M., Mochizuki T., Ushiki T.* // *Meth. Protoc.* 2023. V. 6. № 4. Art. 59.
<https://doi.org/10.3390/mps6040059>
139. *Pavlov E., Aschar-Sobbi R., Campanella M., Turner R.J., Gómez-García M.R., Abramov A.Y.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 13. P. 9420–9428.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013011>

140. Baev A.Y., Angelova P.R., Abramov A.Y. // *Biochem. J.* 2020. V. 477. № 8. P. 1515–1524.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20200042>
141. Günth S., Trutnau M., Kleinstauber S., Hause G., Bley T., Röske I., Harms H., Müller S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 2111–2121.
142. Angelova P.R., Agrawalla B.K., Elustondo P.A., Gordon J., Shiba T., Abramov A.Y., Chang Y.T., Pavlov E.V. // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. № 9. P. 2101–10.
<https://doi.org/10.1021/cb5000696>
143. Yang X., Gao R., Zhang Q., Yung C.C.M., Yin H., Li J. // *Environ. Sci. Technol.* 2024. V. 58 № 32. P. 14249–14259.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.4c04545>
144. Deitert A., Fees J., Mertens A., Nguyen Van D., Maares M., Haase H., Blank L.M., Keil C. *Yeast.* 2024. V. 41. № 10. P. 593–604.
<https://doi.org/10.1002/yea.3979>
145. Grossgebauer K. // *Microsc. Acta.* 1980. V. 83. № 1. P. 49–54.
146. Kolozsvari B., Parisi F., Saiardi A. // *Biochem. J.* 2014. V. 460. № 3. P. 377–385.
<https://doi.org/10.1042/BJ20140237>
147. Omelon S., Georgiou J., Habraken W. // *Biochem. Soc. Trans.* 2016. V. 44. № 1. P. 46–49.
<https://doi.org/10.1042/BST20150231>
148. Lee A., Whitesides G.M. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 16. P. 6838–6846.
<https://doi.org/10.1021/ac1008018>
149. Choi B.K., Hercules D.M., Houalla M. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 20. P. 5087–5091.
<https://doi.org/10.1021/ac000044q>
150. Jiménez J., Lázaro B., Sarrias A., Tadeo F.J., Pérez-Montero M., Clotet J., Bru S. // *STAR Protoc.* 2022. V. 3 № 2. Art. 101363.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101363>

Modern Methods of Inorganic Polyphosphate Analysis in Biological Samples (Review)

L. V. Trilisenko^a, T. V. Kulakovskaya^a, *

^a*Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: alla@ibpm.ru

Inorganic polyphosphates (**polyP**) are universal regulatory compounds and participate in the control of gene expression, stress adaptation, membrane transport, and cell motility. They play an important role in bone tissue development, thrombosis and inflammation processes, signal transmission in nerve cells, and amyloid formation. These polymers participate in phosphorus homeostasis both in living cells and natural and technogenic ecosystems. PolyP are used as fertilizers, food additives, and water treatment compound and flame retardant. Modern highly sensitive and specific methods for polyP analysis are necessary for solving fundamental problems of biochemical process regulation and for a number of practical tasks, such as monitoring the state of environmental objects, food quality, and developing new methods for treating bone diseases, the cardiovascular system, and neurodegenerative pathologies. Currently, efficient and highly specific methods for polyP assay have been developed, such as special extraction methods, enzymatic analysis, electrophoresis, DAPI staining, and microscopic methods, including micro-X-ray analysis. NMR retains its importance, especially for determining the polymer chain length. In this review, we consider polyP analysis methods from the point of view of problems solved in the study of various biological objects, with special attention to the most modern and widespread approaches.

Keywords: inorganic polyphosphate, extraction, enzymatic analysis, electrophoresis, 31P -NMR, fluorescence microscopy, chain length