

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 73 • № 1 • 2018 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзор

- Чемерис А.С., Вахрушева А.В., Деркачева Н.И., Соколова О.С. Регуляция комплексом Agr2/3 преобразований актинового цитоскелета в клетке. Обзор 3

Клеточная биология

- Зеленихин П.В., Горбунова А.С., Бойерляйн К., Макеева А.В., Ильинская О.Н. Индуцированные биназой изменения мембран опухолевых клеток. 10
- Зорникова К.В., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р. Влияние краткосрочного гипоксического стресса на иммуносупрессивную активность периваскулярных мезенхимных стромальных клеток 16

Генетика

- Александров О.С., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Создание St/J/V-геном-специфичного молекулярного маркера на основе полиморфизма локусов 5S-рДНК *Thiopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata* и *Dasypyrum villosum* 22

Методы

- Бессонов И.В., Котлярова М.С., Копицына М.Н., Федулов А.В., Мойсенович А.М., Архипова А.Ю., Богуш В.Г., Багров Д.В., Рамонова А.А., Машков А.Е., Шайтан К.В., Мойсенович М.М. Фотоотверждаемые гидрогели, содержащие спироин или фиброин 29

Микология и альгология

- Анисимова О.В., Штаер О.В. Морфология поровых каналов клеточной стенки у представителей рода *Euastrum* Ralfs (Desmidiaceae) 34
- Георгиев А.А., Белякова Г.А., Чудаев Д.А., Георгиева М.Л., Гололобова М.А. Обнаружение красной водоросли *Thorea hispida* (Thore) Desv. (Rhodophyta) в реке Москве. . . 38

Микробиология

- Васильева С.Г., Шибзухова К.А., Морозов А.С., Лобакова Е.С. Сбор биомассы микроводорослей с помощью сорбентов на основе полиэтиленimina 43
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Секретция протеиназ с фибринолитической активностью микромицетами рода *Aspergillus* . . 47

Физиология

- Пустовит К.Б., Потехина В.М., Пахомов Н.В., Кузьмин В.С. Влияние внеклеточного диаденозинтетрафосфата на биоэлектрическую активность предсердного и желудочкового миокарда крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза. . . 52

CONTENTS

Review

- Chemeris A.S., Vakhrusheva A.V., Derkacheva N.I., Sokolova O.S.* Regulation of the actin cytoskeleton transformation in the cell by Arp2/3 complex. Review 3

Cell Biology

- Zelenikhin P.V., Gorbunova A.S., Beuerlein K., Makeeva A.V., Ilinskaya O.N.* Binase induced changes of tumor cell membranes 10
- Zornikova K.V., Gornostaeva A.N., Andreeva E.R.* The effect of short-term hypoxic stress on immunosuppressive activity of perivascular multipotent stromal cells. 16

Genetics

- Alexandrov O.S., Divashuk M.G., Karlov G.I.* Development of the ST/J/V genome specific molecular marker based on 5S rDNA polymorphism in *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata* and *Dasyphyrum villosum* 22

Methods

- Bessonov I.V., Kotliarova M.S., Kopitsyna M.N., Fedulov A.V., Moysenovich A.M., Arkhipova A.Yu., Bogush V.G., Bagrov D.V., Ramonova A.A., Mashkov A.E., Shaitan K.V., Moisenovich M.M.* Photocurable hydrogels containing methacrylated gelatin and spiroin or fibroin 29

Microbiology

- Vasilieva S.G., Shibzukhova K.A., Morozov A.S., Lobakova E.S.* Harvesting of microalgae biomass with polyethylenimine-based sorbents. 34
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S.* Secretion of proteinases with fibrinolytic activity by micromycetes of the genus *Aspergillus* 38

Mycology and Algology

- Anissimova O.V., Staer O.V.* Morphology of cell wall pore channels in genus *Euastrum* Ralfs (Desmidiaceae) 43
- Georgiev A.A., Belyakova G.A., Chudaev D.A., Georgieva M.L., Gololobova M.A.* New record of red alga *Thorea hispida* (Thore) Desv. (Rhodophyta) in the Moskva River 47

Physiology

- Pustovit K.B., Potekhina V.M., Pakhomov N.V., Kuzmin V.S.* Effects of extracellular diadenosine tetraphosphate on action potentials in atrial and ventricular myocardium of the rat heart during early postnatal ontogenesis 52

ОБЗОР

УДК 577.3+577.353.23

РЕГУЛЯЦИЯ КОМПЛЕКСОМ Arp2/3 ПРЕОБРАЗОВАНИЙ
АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКЕ. ОБЗОРА.С. Чемерис¹, А.В. Вахрушева¹, Н.И. Деркачева², О.С. Соколова^{1,*}¹*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Кафедра биохимии, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Россия, 127473, г. Москва, ул. Десятская, д. 20, стр. 1***e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

Цитоскелет представляет собой сеть белковых филаментов и включает микротрубочки, актиновые филаменты и промежуточные филаменты. Филаменты пронизывают всю цитоплазму и участвуют в поддержании формы клетки, организации и прикреплении органелл, а также в транспорте различных молекул, клеточном делении и передаче сигнала. Для осуществления этих разнообразных и сложных процессов составляющие компоненты цитоскелета должны быть очень динамичными и подвижными, быстро перестраиваться, взаимодействовать друг с другом. Это обеспечивается наличием большого количества вспомогательных белков — нуклеаторов, активаторов, инактиваторов полимеризации и деполимеризации актиновых филаментов. В данном обзоре приведено описание регуляции реорганизации актинового цитоскелета белковым комплексом Arp2/3. В клетке комплекс находится в неактивном состоянии. Его активация происходит под воздействием молекул-активаторов, которые изменяют конформацию и пространственное расположение доменов комплекса, обеспечивая его взаимодействие с мономерным и полимерным актином. Активаторы Arp2/3-комплекса известны давно и включают такие белки, как WASP и WAVE. Все активаторы в своем составе имеют специфический домен VCA, который отвечает за связывание их с Arp2/3-комплексом. Структура комплекса с активаторами была изучена с использованием различных физико-химических методов. Инактиваторы комплекса начали изучать лишь недавно. В настоящее время известно не менее пяти разных белков, которые инактивируют Arp2/3-комплекс, связываясь с различными его субъединицами. Примерами инактиваторов могут служить белки коронин, фактор созревания глии и арпин. Данные о структуре Arp2/3-комплекса с инактиваторами были недавно опубликованы и показали, что все белки-инактиваторы переводят его в “открытое” состояние, отдаляя актиноподобные субъединицы комплекса друг от друга. Исследования пространственной организации актин-связывающих белков необходимы для понимания закономерностей взаимодействия между ними при обеспечении жизнедеятельности клетки. Эти данные можно в дальнейшем использовать при поиске новых лигандов с целью предотвращения метастазирования опухолевых клеток.

Ключевые слова: цитоскелет, актин, актин-связывающие белки, Arp2/3-комплекс, арпин, фактор созревания глии, коронин, обзор

Цитоскелет — динамически перестраивающаяся основа клетки, которая обеспечивает ее передвижение, адгезию, поляризацию, деление, поддерживает форму клетки, а также способствует движению органелл. Цитоскелет представлен нитевидными белковыми комплексами или филаментами. Филаменты различаются по химическому составу, ультраструктуре и функциональным свойствам и подразделяются на три типа: микротрубочки, промежуточные филаменты и актиновые филаменты (микрофиламенты).

Актиновые филаменты представляют собой две спирально закрученные нити толщиной 6–8 нм, состоящие из полимеризованных мономеров актина (G-актин). Полимеризация F-актина начинается со сборки трех мономеров G-актина в тример (так

называемое “ядро нуклеации”) и продолжается при спонтанном присоединении АТФ-актина. Образование актиновых филаментов является крайне энергетически невыгодным процессом из-за нестабильности тримеров G-актина [1], поэтому во всех эукариотических и некоторых патогенных прокариотических клетках присутствуют нуклеаторы — белки, стабилизирующие ядро нуклеации актина. К нуклеаторам относятся Arp2/3-комплекс и формины, а также большое семейство факторов, обеспечивающих нуклеацию (Nucleation Promoting Factors, NPF): белки WASp, WAVE, Spire, Cobl, VopL/VopF, TARP и Lmod [2]. Эти молекулы контролируют скорость полимеризации, а также влияют на структуру образуемых сетей актина. Актиновые филаменты (F-актин) полярны, они имеют плюс-конец

(еще называемый “тупым”), на котором идет быстрое связывание G-актина, и минус-конец (“острый”), который растет медленней.

Регуляция работы актинового цитоскелета поддерживается большим набором белков, взаимодействующих с актиновыми филаментами и мономерными молекулами глобулярного актина [3]. В клетке различные актин-связывающие белки выполняют разнообразные функции: тимозин $\beta 4$ блокирует сборку актинового филамента, профилин — обеспечивает замену нуклеотида, превращая АДФ-актин в АТФ-актин, и ингибирует удлинение на остром конце, кофилин действует обратным образом: ингибирует замену нуклеотида и обеспечивает нуклеацию. Кэпирующие белки связываются с растущим актиновым филаментом и блокируют полимеризацию на тупом конце; моторные белки, принадлежащие к семейству миозинов, используют цикл гидролиза АТФ для перемещения вдоль актинового филамента, в основном к тупому концу [4].

В клетке многие актин-связывающие белки находятся в автоингибированном состоянии. Их активация происходит под воздействием молекул-активаторов, которые изменяют конформацию и пространственное расположение доменов актин-связывающих белков, обеспечивая их взаимодействие с мономерным и полимерным актином.

Arp2/3-комплекс и его активация

Движение клеток, происходящее при воспалении, хемотаксисе или метастазировании, как правило, начинается с образования ламеллиподии. Формирование ламеллиподии контролируется комплексом белков с общим названием Arp2/3. Сам по себе Arp2/3-комплекс имеет низкую способность к нуклеации, поэтому для его активации необходимы белки семейства WASp [5]. Arp2/3-комплекс состоит из семи субъединиц: двух актиноподобных (Arp2 и Arp3), а также пяти дополнительных субъединиц: ARPC1 (p40), ARPC2 (p35/p34), ARPC3 (p21/p18), ARPC4 (p20/p19) и ARPC5 (p16/p15). Кристаллическая структура бычьего Arp2/3-комплекса была определена в 2001 г. с разрешением $2\text{ \AA}$ [6] (рис. 1, А). Было отмечено, что структура субъединиц Arp2 и Arp3 гомологична структуре мономерного актина, и поэтому высказано предположение, что взаимодействие этих двух субъединиц и активатора (WASp) может служить сайтом нуклеации. Однако анализ кристаллической структуры не давал ответ на вопрос, как происходит нуклеация, так как субъединицы Arp2 и Arp3 находились слишком далеко друг от друга. Позже с помощью электронной микроскопии было показано, что Arp2/3-комплекс естественным путем флуктуирует между открытым (неактивным) и закрытым (активным) конформационными состояниями (рис. 1, В и Г) до тех пор, пока не свяжется с актиновым филаментом и не стабилизируется [7]. Arp2/3-комплекс садится на уже существующий (материнский) филамент и в присутствии АТФ,

активаторов и пула актиновых мономеров образует так называемый “узел разветвления” (рис. 1, Б), иницируя рост под углом 70° к материнскому филаменту дочернего актинового филамента, образующего тупой конец для посадки новых мономеров актина и дальнейшей элонгации. С использованием электронной томографии Рулье с соавт. удалось получить реконструкцию узла разветвления [8]. Структурные данные показали, что для формирования дочернего филамента Arp2/3-комплекс подвергается значительным конформационным изменениям. Субъединицы Arp2 и Arp3 сближаются, образуя псевдоактиновый димер, который является платформой для новых мономеров актина. Субъединицы ARPC2 и ARPC4 образуют гетеродимер, представляющий собой важнейшее для функционирования комплекса структурное ядро и отвечающий за присоединение Arp2/3-комплекса к материнскому актиновому филаменту (рис. 2, А). Всего с Arp2/3-комплексом взаимодействуют пять актиновых мономеров материнского филамента, причем те два из них, которые взаимодействуют с гетеродимером ARPC2/ARPC4, также претерпевают конформационные изменения. Таким образом, при образовании узла разветвления все субъединицы Arp2/3-комплекса так или иначе взаимодействуют с материнским филаментом. Площадь их соприкосновения составляет $\sim 9000\text{ \AA}^2$.

Активность Arp2/3-комплекса регулируется факторами нуклеации (Nucleation Promoting Factor, NPF), т.е. активаторами этого комплекса, а также ингибиторами, которые переводят его в неактивное состояние. Считается, что субъединицы Arp2 и Arp3 имеют низкое сродство друг к другу в отсутствие NPF [9]. Наиболее изученные активаторы, к которым относятся WASp и WAVE (WASP-Family Verprolin Homologous Protein; белок, гомологичный верпролину), связываются как с Arp2/3-комплексом, так и с мономерами актина. Этому способствует структурный мотив, общий для всех известных активаторов Arp2/3-комплекса — VCA-домен, состоящий из трех коротких фрагментов: V-мотива (гомолог верпролина, богатого пролиновыми мотивами актин-связывающего белка, также называемый WH2, или гомолог WASP), С-мотива (центрального) и А-мотива (кислотного). V-мотив связывает G-актин, С-мотив способствует связыванию VCA как с мономерами актина, так и с Arp2/3-комплексом, А-мотив связывает только Arp2/3-комплекс [10]. В силу сродства VC-домена к актину и СА-домена к Arp2/3-комплексу, VCA-домен соединяет Arp2/3-комплекс и первые мономеры дочернего филамента, стабилизируя ядро нуклеации. Предполагается, что С-мотив сначала способствует активации Arp2/3-комплекса, а затем предоставляет первый мономер актина для построения дочернего филамента [11]. Свободный VCA-домен неструктурирован, но он приобретает вторичную структуру при контакте с комплексом Arp2/3 или с материнским актиновым филаментом [7, 8, 10, 12]. Таким образом, VCA-домен выполняет следующие функции:

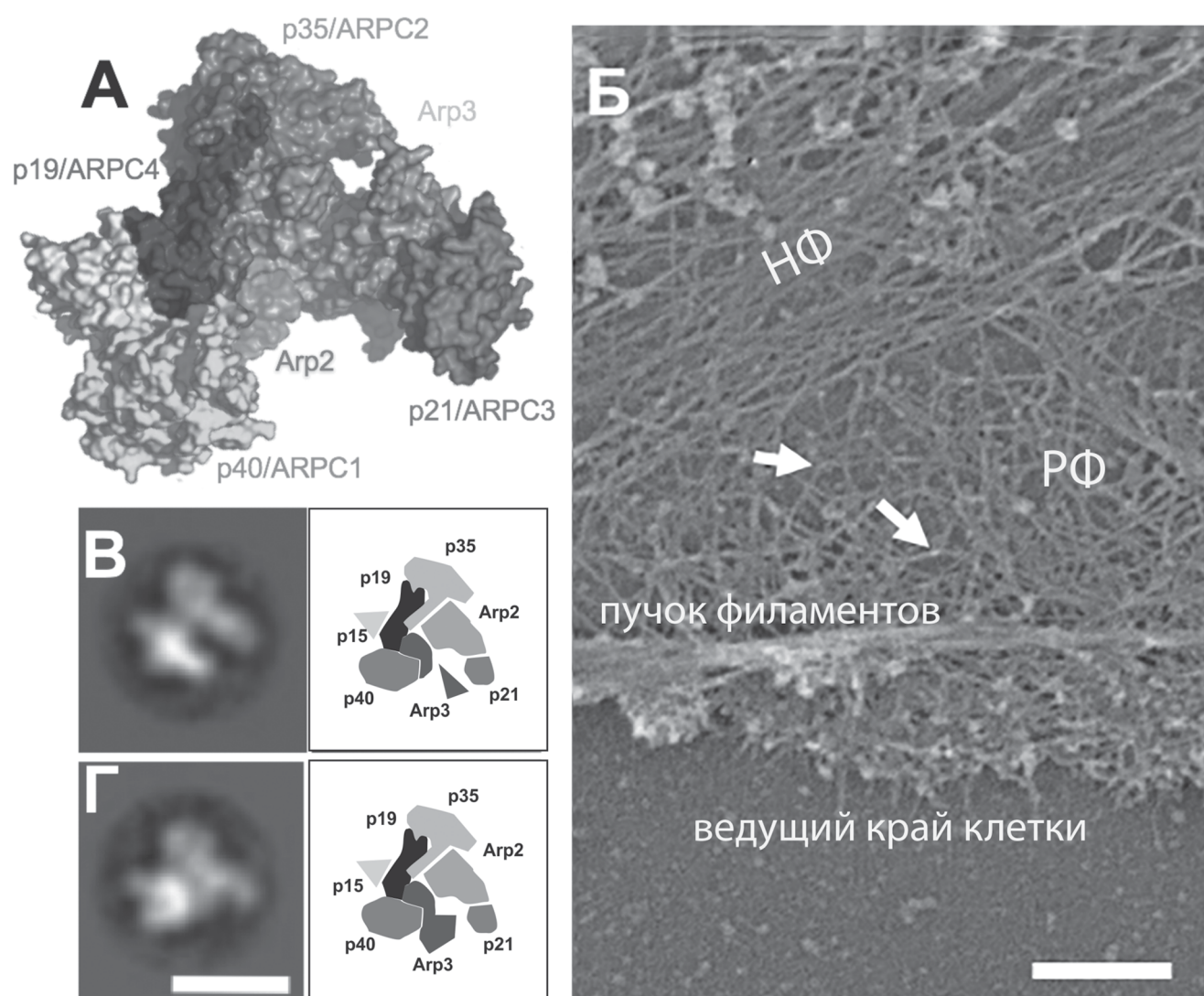


Рис. 1. Структура комплекса Arp2/3. **А** – Кристаллическая структура Arp2/3-комплекса (pdb код: 1K8K), отдельные субъединицы подписаны; **Б** – платиновая реплика сети актиновых филаментов на ведущем крае клетки, стрелками показаны комплексы в узлах разветвления (НФ – неразветвленные филаменты, РФ – разветвленные филаменты, масштабный отрезок – 500 нм). **В** и **Г** – Конформационные изменения Arp2/3-комплекса по данным ПЭМ: **В** – открытый комплекс, слева – ПЭМ-изображение, справа – схематическое изображение (субъединицы подписаны, серая стрелка указывает на щель между Arp2- и Arp3-субъединицами); **Г** – закрытый комплекс, слева – ПЭМ-изображение, справа – схематическое изображение, масштабный отрезок – 10 нм

– вызывает конформационные изменения в Arp2/3-комплексе для сближения субъединиц Arp2 и Arp3;

– повышает сродство Arp2/3 комплекса к материнскому филаменту;

– захватывает первые мономеры актина, иницируя таким образом рост дочернего филамента.

Работа VCA-доменов, в свою очередь, также регулируется. WASP- и WAVE-комплексы в клетке находятся в автоингибированном состоянии. Только после активации ГТФ-азой Ras VCA-мотив становится доступным для связывания с Arp2/3-комплексом [13].

Для изучения взаимодействия Arp2/3-комплекса с VCA-доменами применялись различные методы, такие как малоугловое рентгеновское рассеяние, ядерно-магнитный резонанс, рентгеновская кристаллография, перекрестные сшивки различных доменов и др. На основании полученных данных

были идентифицированы субъединицы Arp2/3-комплекса, отвечающие за связывание с VCA-доменами: Arp2, Arp3, ARPC1 и ARPC3. Было показано, что Arp2/3-комплекс содержит два сайта связывания VCA-доменов. Падрик и Розен [13] показали связывание Arp2/3-комплекса с двумя VCA-доменами, меченными Alexa 488, а Ти с соавторами обнаружили, что с одним Arp2/3-комплексом одновременно могут взаимодействовать два изолированных СА-домена [14]. В одном из последних исследований было показано, что изолированные VCA-домены разных активаторов (N-WASP и WAVE2) в присутствии актина связываются с Arp2/3-комплексом в соотношении 2:1 [15].

Эти данные хорошо согласуются с тем, что активаторы Arp2/3-комплекса обычно кластеризуются на клеточной мембране или связываются с белковыми партнерами-димерами [16, 17]. Связывание сразу двух активаторов, вероятно, способствует

более эффективной активации Arp2/3-комплекса. Недавние исследования показали, что два различных сайта связывания VCA-доменов на Arp2/3-комплексе находятся на субъединицах Arp3 и Arp2/ARPC1, причем сайт на субъединице Arp2/ARPC1 оказывает большее влияние на активацию [13, 15, 18].

Ингибирование Arp2/3-комплекса

Большинство известных факторов деполимеризации актиновых филаментов из семейства ADF (Actin Depolymerization Factors, факторы деполимеризации актина), такие как кофилин, дребрин и Abp1, напрямую связывают актиновый филамент и/или мономер актина. Прямое же взаимодействие Arp2/3-комплекса с инактиваторами, переводящими Arp2/3-комплекс из закрытого (активного) состояния в открытое (неактивное), изучено недостаточно. Различные инактиваторы взаимодействуют с разными субъединицами комплекса (рис. 2, Б–Д). Например, субъединица p35/ARPC2 передает сигналы активации другим субъединицам Arp2/3-комплекса. Мутации в p35/ARPC2-субъединице могут приводить к ингибированию активности и к изменению конформации Arp2/3-комплекса [7]. Ингибитор Arp2/3-комплекса – белок коронин – связывается с этой субъединицей и переводит все молекулы Arp2/3-комплекса, с которыми связан, в открытую (неактивную) конформацию (рис. 2, Б) [7, 18]. Было высказано предположение, что сигналы передаются через длинную С-концевую спираль p35/ARPC2-субъединицы, которая достигает Arp2. Коронины – это высококонсервативные белки, связывающие F-актин и взаимодействующие также с микротрубочками [19]. Они относятся к семейству белков, содержащих WD-повтор. WD-повтор – это структурный мотив, состоящий примерно из 40–60 аминокислот, которые заканчиваются триптофаном (W) и аспаратом (D). Известны семь изоформ коронина, из которых хорошо изучены две – 1А и 1В. Функция коронинов состоит в регуляции клеточной подвижности. Было показано, что нокдаун коронина 1А у мышей приводит к нарушениям работы иммунной системы [20]. Коронин 1В регулирует как образование ламеллиподий, так и общую подвижность клетки. Он отвечает за диссоциацию актиновых филаментов, инактивируя Arp2/3-комплекс. Этот процесс противопоставляется работе белка кортактина – стабилизатора разветвленных актиновых филаментов [21].

Другие известные ингибиторы Arp2/3-комплекса, такие как Pick1 и Gadkin, имитируют под кислотный мотив VCA-домена и являются его прямыми конкурентами за связывание с Arp2/3-комплексом [22].

Схожим образом действует и регулятор Arp2/3-комплекса GMF (Glia Maturation Factor, фактор созревания глии), который имеет гомологию с центральным мотивом VCA-домена. GMF – это высо-

коконсервативный белок с молекулярной массой 18 кДа, он относится к белкам семейства ADP и вызывает диссоциацию дочернего и материнского филаментов. Обнаружено, что GMF препятствует связыванию актина с Arp2/3-комплексом, что отличает GMF от белков семейства ADP/кофилинов. Анализ кристаллической структуры комплекса Arp2/3 с GMF показал, что один сайт связывания с высоким сродством к GMF расположен рядом с субъединицей Arp2 (рис. 2, В) [23]. Однако помимо обычной открытой конформации связывание GMF индуцирует и нетипичную конформацию Arp2/3-комплекса, в которой наблюдается значительный сдвиг субъединицы ARPC3 к Arp3 (рис. 2, Д) [18]. Перекрестные шивки, электронная микроскопия и моделирование показывают наличие второго сайта связывания GMF на субъединице Arp3, имеющего меньшее сродство к GMF [24].

Недавно открытый инактиватор Arp2/3-комплекса – арпин, консервативный белок с молекулярной массой около 25 кДа, синтезируется в ламеллиподиях. В отличие от вышеописанных инактиваторов, арпин не имеет V- и С-мотивов и соединяется с Arp2/3 комплексом через С-концевой А-мотив. Предполагается, что главная роль арпина заключается в контроле направления миграции клеток [25]. Показано, что после удаления арпина из клеток миграция их ускоряется, а траектории движения выпрямляются. Присоединение арпина, а также его отдельного А-домена к активному Arp2/3-комплексу ингибирует дальнейшую полимеризацию актина [25]. С помощью электронной микроскопии и молекулярного моделирования были найдены и охарактеризованы два сайта связывания арпина, расположенные на Arp3-субъединице и рядом с Arp2-субъединицей (рис. 2, Г) [18, 26], что согласуется с наличием двух сайтов связывания для VCA-доменов. Примечательно, что при взаимодействии с инактиваторами различной структуры, взаимодействующими с разными субъединицами, Arp2/3-комплекс претерпевает одинаковые конформационные изменения [7, 18, 24]. Так как присоединение активаторов и ингибиторов значительно изменяет конформацию Arp2/3-комплекса [7, 10, 18], это позволяет тонко регулировать его активность.

В заключение следует отметить, что одним из важных признаков опухолевой трансформации клеток считают изменение цитоскелета. Именно изменения актиновых филаментов непосредственно связывают со способностями раковых клеток к повышенной подвижности и метастазированию. Имеются данные о том, что при опухолевой трансформации клеток происходят изменения в экспрессии генов, кодирующих некоторые актин-связывающие белки, наличие которых коррелирует со способностью клеток к инвазивному росту и метастазированию [27]. Таким образом, молекулы, которые контролируют динамику перестроек актинового цитоскелета, могут иметь большую диагностиче-



Рис. 2. Схема активации и ингибирования комплекса Arp2/3. **А** – активированный комплекс, готовый к нуклеации; **Б** – инактивированный комплекс с присоединенной молекулой коронина; **В** – инактивированный комплекс с присоединенной молекулой GMF1 (стандартная открытая конформация); **Г** – инактивированный комплекс с присоединенными молекулами арпина в двух сайтах связывания; **Д** – инактивированный комплекс с присоединенной молекулой GMF1 (новая открытая конформация). Субъединицы комплекса окрашены, как на рис. 1 **В**, **Г**

скую ценность [28]. В частности, инактиваторы Arp2/3-комплекса могут применяться для регуляции и предотвращения процессов миграции и метастазирования опухолевых клеток.

Авторы выражают благодарность доктору А. Коллинзу за помощь в получении платиновой реплики. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00234).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee S.H., Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells // *Mol. Cells*. 2010. Vol. 29. N 4. P. 311–325.
- Dominguez R. Actin filament nucleation and elongation factors – structure-function relationships // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2009. Vol. 44. N 6. P. 351–366.
- Shimada A., Nyitrai M., Vetter I.R., Kühlmann D., Bugyi B., Narumiya S., Geeves M.A., Wittinghofer A. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization // *Mol. Cell*. 2004. Vol. 13. N 4. P. 511–522.
- Winder S.J., Ayscough K.R. Actin-binding proteins // *J. Cell Sci.* 2005. Vol. 118. N 4. P. 651–654.
- Pfaendtner J., Volkman N., Hanein D., Dalhaimer P., Pollard T.D., Voth G.A. Key structural features of the actin filament Arp2/3 complex branch junction revealed by molecular simulation // *J. Mol. Biol.* 2012. Vol. 416. N 1. P. 148–161.
- Robinson R.C., Turbedsky K., Kaiser D.A., Marchand J.-P., Higgs H.N., Choe S., Pollard T.D. Crystal structure of Arp2/3 complex // *Science*. 2001. Vol. 294. N 5547. P. 1679–1684.
- Rodal A.A., Sokolova O., Robins D.B., Daugherty K.M., Hippenmeyer S., Riezman H., Grigorieff N., Goode B.L. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 26–31.
- Rouiller I., Xu X.P., Amann K.J., Egile C., Nickell S., Nicastro D., Li R., Pollard T.D., Volkman N., Hanein D. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex // *J. Cell. Biol.* 2008. Vol. 180. N 5. P. 887–895.
- Pollard T.D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2007. Vol. 36. P. 451–477.
- Xu X.P., Rouiller I., Slaughter B.D., Egile C., Kim E., Unruh J.R., Fan X., Pollard T.D., Li R., Hanein D., Volkman N. Three-dimensional reconstructions of Arp2/3 complex with bound nucleation promoting factors // *EMBO J.* 2012. Vol. 31. N 1. P. 236–247.
- Kelly A.E., Kranitz H., Dtsch V., Mullins R.D. Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the Arp2/3 complex // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. N 15. P. 10589–10597.
- Goley E.D., Rodenbusch S.E., Martin A.C., Welch M.D. Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor // *Mol. Cell*. 2004. Vol. 16. N 2. P. 269–279.
- Padrick S.B., Rosen M.K. Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. Vol. 79. P. 707–735.
- Ti S.C., Jurgenson C.T., Nolen B.J., Pollard T.D. Structural and biochemical characterization of two binding sites for nucleation-promoting factor WASP-VCA on Arp2/3

complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108. N 33. P. E463–E471.

Boczowska M., Rebowski G., Kast D.J., Dominguez R. Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-WCAs // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. 3308.

Padrick S.B., Cheng H.C., Ismail A.M., Panchal S.C., Doolittle L.K., Kim S., Skehan B.M., Umetani J., Brautigam C.A., Leong J.M., Rosen M.K. Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins // *Mol. Cell.* 2008. Vol. 32. N 3. P. 426–438.

Campellone K.G., Webb N.J., Znameroski E.A., Welch M.D. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport // *Cell.* 2008. Vol. 134. N 1. P. 148–161.

Sokolova O.S., Chemeris A., Guo S., Alioto S.L., Gandhi M., Padrick S., Pechnikova E., David V., Gautreau A., Goode B.L. Structural basis of Arp2/3 complex inhibition by GMF, Coronin, and Arpin // *J. Mol. Biol.* 2017. Vol. 429. N 2. P. 237–248.

Gandhi M., Achard V., Blanchoin L., Goode B.L. Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 34. N 3. P. 364–374.

Fger N., Rangell L., Danilenko D.M., Chan A.C. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis // *Science.* 2006. Vol. 313. N 5788. P. 839–842.

Cai L., Makhov A.M., Schafer D.A., Bear J.E. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing

actin branches in lamellipodia // *Cell.* 2008. Vol. 134. N 5. P. 828–842.

Rocca D.L., Martin S., Jenkins E.L., Hanley J.G. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis // *Nat. Cell. Biol.* 2008. Vol. 10. N 3. P. 259–271.

Luan Q., Nolen B.J. Structural basis for regulation of Arp2/3 complex by GMF // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. Vol. 20. N 9. P. 1062–1068.

Ydenberg C.A., Padrick S.B., Sweeney M.O., Gandhi M., Sokolova O., Goode B.L. GMF severs actin-Arp2/3 complex branch junctions by a cofilin-like mechanism // *Curr. Biol.* 2013. Vol. 23. N 12. P. 1037–1045.

Dang I., Gorelik R., Sousa-Blin C. et al. Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration // *Nature.* 2013. Vol. 503. N 7475. P. 281–284.

Попинако А.В., Антонов М.Ю., Чемерис А.С., Шайтан К.В., Соколова О.С. Анализ взаимодействия Arp2/3-комплекса с инактиватором арпином методом молекулярной динамики // *Биофизика.* 2017. Т. 62. № 6. С. 1–7.

Huff T., Müller C.S., Otto A.M., Netzker R., Hannappel E. β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001. Vol. 33. N 3. P. 205–220.

Giganti A., Friederich E. The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions // *Prog. Cell Cycle Res.* 2003. Vol. 5. P. 511–525.

Поступила в редакцию
09.11.2017

Принята в печать
15.12.2017

REVIEW

REGULATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON TRANSFORMATION IN THE CELL BY Arp2/3 COMPLEX. REVIEW

A.S. Chemeris¹, A.V. Vakhrusheva¹, N.I. Derkacheva², O.S. Sokolova^{1,*}

¹Department of Bioengineering, School of Biology,

Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Biochemistry, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
Delegatskaya st. 20–1, Moscow, 127473, Russia;

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

The cytoskeleton is formed by a network of protein filaments, including microtubules, actin filaments and intermediate filaments. Filaments permeate the entire cytoplasm; they are involved in maintaining the cell shape, they organize and anchor the organelles, they control the transport of various molecules, cell division and provide signal transduction. To implement these diverse and complex functions, the components of the cytoskeleton must be very dynamic and mobile, be able to rebuilt quickly and interact with each other. This is due to the presence of a large number of actin-binding proteins – nucleators, activators, inactivators of polymerization and depolymerization of actin filaments. This review describes the regulation of actin dynamics by the Arp2/3 complex. In the cell, this complex is in an inactive state. Its activation occurs after the interaction with activators. Activators change the conformation and spatial arrangement of the domains of the Arp2/3 complex, providing its interaction with monomeric and polymeric actin. Activators of the Arp2/3-complex have been known for a long time and include such proteins as WASp and WAVE. All activators possess a specific VCA domain, which is responsible for their binding to the Arp2/3 complex. The structure of the complex with bound activators has been studied using various physico-chemical methods. The inactivators of the complex only recently attracted specific attention of the investigators. At present, at least five different proteins are known to inactivate the Arp2/3 complex by binding to its various subunits. Examples of inactivators are coronin, Gmf and arpin. The structure of the Arp2/3 complex with inactivators was recently published and showed that despite their binding to different subunits of the complex, all

inactivators transform the Arp2/3 complex into an “open” state, moving the actin-like Arp subunits apart from each other. Studies of the spatial organization of actin-binding proteins are necessary for understanding the patterns of interaction between them while providing the vital activity of the cell. These data can later be used in the search for new ligands to prevent metastasis of tumor cells.

Keywords: *cytoskeleton, actin, actin-binding proteins, Arp2/3 complex, arpin, glia maturation factor, coronin, review*

Сведения об авторах

Чемерис Ангелина Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-93-5738; e-mail: angelina1707@mail.ru

Вахрушева Анна Владимировна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-5738; e-mail: vakhrusheva.ann@yandex.ru

Деркачева Надежда Игоревна — канд. биол. наук, доц. кафедры биохимии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова. Тел.: 8-495-938-0005; e-mail: nadya-derk@yandex.ru

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, проф. РАН, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-0005; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.1+577.29+616.006

ИНДУЦИРОВАННЫЕ БИНАЗОЙ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОКП.В. Зеленихин¹, А.С. Горбунова¹, К. Бойерляйн², А.В. Макеева^{1,*}, О.Н. Ильинская¹¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18;²Институт фармакологии им. Рудольфа Буххайма, университет Гиссена, Германия, 35392, г. Гиссен, Шубертштрассе, д.81

*e-mail: avmakeeva.kpfu@gmail.com

Экзогенные рибонуклеазы бацилл могут селективно индуцировать апоптоз злокачественных клеток. В работе проведен анализ способности рибонуклеазы *Bacillus pumilus* — биназы — индуцировать процессы, приводящие к динамическому нарушению целостности мембран клеток аденокарциномы легких человека линии A549. Охарактеризовано влияние фермента в различных концентрациях на состояние цитоплазматической мембраны клеток и мембран митохондрий. При помощи методов проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии установлено, что воздействие биназы приводит к нарушению нормального функционирования мембран обоих типов, причем вначале нарушения затрагивают мембраны митохондрий. Проведенное исследование позволило выявить и визуализировать этапы влияния биназы на мембранные структуры клеток-мишеней и подтвердить, что бактериальная РНКазы индуцирует апоптоз клеток-мишеней преимущественно по “внутреннему” (митохондриальному) пути.

Ключевые слова: РНКазы, *Bacillus pumilus*, биназа, противоопухолевая активность, повреждение мембран, аденокарцинома легкого A549

В настоящее время пристальное внимание уделяется биологическим эффектам ферментов-рибонуклеаз (РНКаз), которые могут не зависеть от их непосредственных каталитических функций: таким, как участие в регуляторных системах клетки, контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к клеткам опухолей, защита от вирусных и микробных патогенов. Особый интерес представляют РНКазы организмов, филогенетически далеких от человека и вследствие этого не подверженных действию ингибитора РНКаз в клетках млекопитающих — РНКазы хладнокровных позвоночных [1], грибов [2] и бактерий [3]. Благодаря наличию селективного цитотоксического действия по отношению к злокачественным клеткам РНКазы *Bacillus pumilus* (биназа) может рассматриваться в качестве потенциального противоопухолевого агента. Установлено селективное действие биназы на клетки карциномы легкого человека линии A549 [4], фибробласты, экспрессирующие онкоген *v-Ras* [5], клетки миелоидного лейкоза [6], клетки рака молочной железы, в том числе и трижды негативные [7]. РНКазы в высоких концентрациях оказывают цитотоксическое [8, 9] и генотоксическое действие [10], а также ингибируют активность Са-зависимых калиевых каналов (K_{Ca} -каналов), приводя к апоптозу [11]. Ингибирование активности K_{Ca} -каналов сопровождается появлением морфологических маркеров апоптоза (вакуолизация цитоплазмы, конденсация и фрагментация хроматина, уменьшение объема клеток). Однако в имеющемся массиве данных от-

сутствуют сведения о динамике изменений функционального состояния клеточных мембран опухолевых клеток при действии биназы.

Целью настоящей работы стало выявление этапных изменений состояния цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и мембран митохондрий клеток аденокарциномы легкого линии A549 при обработке биназой.

Материалы и методы

Фермент. В работе использовали биназу — гуанил-специфичную РНКазу *Bacillus pumilus* (молекулярная масса 12,3 кДа, $pI=9,5$, 109 аминокислотных остатков) в высоких концентрациях (100–500 мкг/мл), для которых ранее было установлено апоптоз-индуцирующее действие на ряде линий раковых клеток [4, 6, 7]. Биназа была изолирована как гомогенный белок из культуральной жидкости продуцента по методике, описанной Дудкиной с соавт. [12]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [13] и высокополимерной дрожжевой РНК [10].

Клеточная линия и условия культивирования. Клетки карциномы легких человека линии A549 (Американская коллекция клеточных культур, Манассас, США) культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma, Германия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 mM глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C. Клетки с культуральных сосудов

собирали согласно описанной ранее методике [14], засекали в 96-луночные планшеты (ibidi, Германия) по 30 мкл суспензии (10^6 /мл) клеток в лунку. По достижении клетками 70% сомкнутого монослоя в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл свежей среды DMEM, затем через определенные интервалы времени (0, 4, 8, 24, 48 и 72 ч) добавляли биназу до конечной концентрации 500 мкг/мл.

Характеристика повреждений ЦПМ при помощи флуоресцентной микроскопии. С целью выявления мембрано-повреждающего действия биназы монослои клеток в пробах окрашивали реактивом LIVE/DEAD (Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity, L-7013) по инструкции фирмы-производителя (Invitrogen, США). Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DM 6000B (Германия); интенсивность флуоресцентного сигнала рассчитывали с использованием компьютерной программы Leica FW4000.

Цитофлуориметрическая детекция повреждений ЦПМ и мембран митохондрий. Параллельно осуществляли детекцию изменения доли клеток с поврежденной ЦПМ и низким мембранным потенциалом митохондрий в популяции с помощью двойного окрашивания йодидом пропидия (PI) (Sigma, США) и потенциал-зависимым красителем йодидом 3,3'-ди-гексилосакарбодиазанин (DiOC_6) (Molecular Probes, США) на проточном цитофлуориметре BD FACS-Canto II (Becton Dickinson, США). РНКазу вносили в среду культивирования в конечных концентрациях 100 и 300 мкг/мл, клетки инкубировали с ферментом в течение 24 и 48 ч. По окончании срока инкубации среду культивирования отбирали и вносили в центрифужные пробирки для предотвращения потерь клеток, сохранивших целостность, но уже потерявших способность к адгезии. Снятие клеток с культуральных планшетов осуществляли трипсинизацией (0,25% трипсин-ЭДТА; ПанЭко, Россия). Объединенные образцы центрифугировали 5 мин (300g, комнатная температура), осадок ресуспендировали в 1 мл 0,01 М фосфатно-солевого буфера (pH 7,2). Затем вносили в суспензию клеток DiOC_6 в конечной концентрации 50 нМ и выдерживали ее 20 мин в темноте при температуре 37°C. PI до конечной концентрации 5 мкг/мл добавляли за 2 мин до начала измерений. При анализе цитометрических данных обсчитывали характеристики флуоресцентного сигнала для не менее чем $2 \cdot 10^4$ клеток для каждого образца в пяти повторах в каждом из трех независимых экспериментов.

Конфокальная лазерная микроскопия. Для более подробной визуализации мембранных компартментов обработанных биназой клеток использовали конфокальную лазерную микроскопию с применением комбинации флуоресцентных красителей CellVue Claret Dye (Sigma-Aldrich, США), которые позволяют детектировать цитоплазматическую мембрану, и DiOC_6 . Окрашивание осуществляли согласно рекомендациям производителя, исследование

проводили на лазерном конфокальном микроскопе LSM 780 (Zeiss, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0. Все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторах. В качестве критерия достоверности различий использовали критерий Манна-Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Для выявления этапных изменений состояния мембран клеток аденокарциномы легкого линии A549 мы применили флуоресцентные красители LIVE/DEAD (Invitrogen, США) и PI, дифференциально окрашивающие клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной, а также потенциал-зависимый краситель DiOC_6 , выявляющий повреждение мембран митохондрий. Биназа, воздействующая на клетки в течение 8 ч, не оказывала повреждающего действия на мембраны (табл. 1). Целостность монослоя не нарушалась, количество клеток, окрашиваемых красителем LIVE/DEAD, было минимально и в варианте с биназой достоверно не отличалось от такового в варианте без обработки. Однако известно, что в этот временной промежуток биназа интернализуется клетками и проникает в ядро [4]. Установлено, что у ЦПМ клеток A549 между 6-м и 8-м ч действия биназы на 14% возрастает проницаемость для макромолекул, измеренная по проникновению в клетки альбумина, меченного трипановым синим [4], причем после 8 ч проницаемость ЦПМ возвращается к уровню таковой в необработанных клетках. Можно предположить, что эти изменения проницаемости ЦПМ связаны с временной активацией эндоцитоза, поскольку доля клеток с нарушенной ЦПМ в монослое на 8-й ч культивирования в присутствии фермента не возрастает по сравнению с вариантом без обработки ферментом (табл. 1, рис. 1, А–Е).

С увеличением времени культивирования происходило увеличение числа клеток с поврежденной ЦПМ. Через 24, 48 и 72 ч роста в монослое наблюдали незначительное возрастание числа таких клеток (1,3; 1,7; 2,2% от общего числа в соответствующее время). Обработка биназой усиливала этот эффект — доля клеток с поврежденной мембраной составила 2,3; 3,4; 8,4%, соответственно, и при действии биназы в течение 72 ч превысила контрольный показатель в 4 раза (табл. 1). Ранее нами было показано, что под действием биназы не просто возрастает количество клеток с поврежденной мембраной, но и фиксируется нарушение функций мембранных белков. Так, известно, что половина клеток популяции через 24 ч действия биназы теряют способность реагировать на активирующее действие ионов Ca^{2+} , запускающее открытие каналов hSK4 для тока калия. Даже в клетках, которые способны активировать каналы в ответ на Ca^{2+} , калиевый ток снижен на 30% [11], хотя лишь

Таблица 1

Изменение в процессе инкубации в присутствии биназы числа клеток линии A549 с поврежденной мембраной

Время инкубации, ч	Количество клеток			
	Обработка биназой (500 мкг/мл)		Без обработки биназой	
	С целой мембраной, ед./поле зрения	С поврежденной мембраной, ед./поле зрения (% от общего числа клеток)	С целой мембраной, ед./поле зрения	С поврежденной мембраной, ед./поле зрения (% от общего числа клеток)
0	143,7±3,1	1,3±1,1 (0,9)	138,3±2,4	1±0,7 (0,7)
4	141±2,0	2,3±2,1 (1,3)	142±3,2	1,7±1,0 (1,1)
8	144,7±3,3	1,7±1,3 (1,1)	131±3,1	1±0,6 (0,8)
24	141±1,1	3,3±0,2 (2,3)*	149,7±4,3	2±0,3 (1,3)
48	129±1,8	4,7±0,8 (3,4)*	136±1,7	2,3±0,4 (1,7)
72	108,7±1,2	14,3±2,2 (8,4)*	139±1,2	3±1,2 (2,2)

* $p \leq 0,05$ при сравнении с соответствующим вариантом без обработки РНКазой.

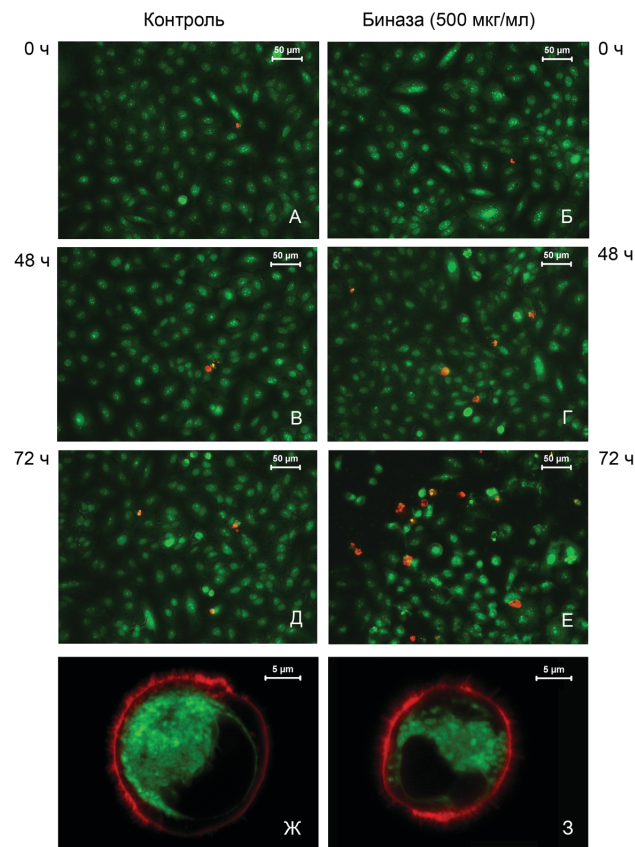


Рис. 1. Визуализация клеток карциномы легкого человека A549, обработанных и не обработанных биназой в течение 0–72 ч (А–Е). Окраска LIVE/DEAD. Клетки с поврежденной мембраной окрашены красным цветом. Масштабная линейка – 50 мкм. Лазерная конфокальная микроскопия клеток A549 после 24 ч инкубации с РНКазой (З) и без нее (Ж). Масштабная линейка – 5 мкм. Окраска CellVue Claret и DiOC₆

малая часть клеток окрашивается PI как клетки с поврежденной мембраной (табл. 1).

Лазерная конфокальная микроскопия позволила зафиксировать снижение интенсивности флуоресценции потенциал-зависимого красителя DiOC₆

в митохондриях клеток A549 после 24 ч их инкубации в присутствии биназы (рис. 1, Ж, З), что свидетельствует о влиянии экзогенной РНКазы на энергетический статус клетки.

Использование двойного окрашивания DiOC₆/PI и проточной цитометрии позволило точнее охарактеризовать влияние биназы на мембранные структуры клеток A549. РНКаза обладала способностью индуцировать нарушения как цитоплазматических, так и митохондриальных мембран (рис. 2). Через 24 ч культивирования в присутствии биназы доля клеток с низким потенциалом мембран митохондрий (DiOC₆⁻) составила 15% и 27% для концентраций РНКазы 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, соответственно, в то время как значение данного показателя в варианте без обработки ферментами не превышало 9%. Увеличение времени инкубации с РНКазой до 48 ч привело к дальнейшему усилению эффекта; в случае большей исследованной концентрации (300 мкг/мл) доля клеток с низким мембранным потенциалом митохондрий достигла 36%. В концентрации 100 мкг/мл биназа за это время уже не приводила к появлению статистически достоверных различий с контролем значений митохондриального потенциала. Вероятно, это связано с частичной протеолитической деградацией интернализованного фермента клетками-мишенями в ходе длительной инкубации.

Оказалось, что обработка биназой опосредует нарушение целостности ЦПМ клеток A549; это подтверждают данные флуоресцентной микроскопии. Однако доля клеток с пермеабилizованной ЦПМ (PI⁺), установленная при помощи проточной цитометрии, более чем вдвое превышала значение данного показателя, определенного микроскопически, и достигала 17% в варианте с обработкой ферментом в концентрации 300 мкг/мл в течение 48 ч (рис. 2). Это может объясняться тем, что протокол подготовки образцов для флуоресцентной микроскопии допускает потерю клеток, лишившихся адгезивных свойств. Таким образом, цитометрический

анализ в данном контексте представляется более предпочтительным, поскольку позволяет сохранить всю популяцию клеток и проанализировать их состояние с большей точностью.

Проведенное исследование позволило выявить и визуализировать разные этапы влияния биназы на мембранные структуры клеток-мишеней. Интернализация фермента (рис. 3, Б, 2) сопровождается кратковременным увеличением проницаемости ЦПМ для белков, затем он опосредует процессы, приводящие к нарушению целостности митохондриальных мембран (рис. 3, Б, 3). Действительно, ранее мы показали, что биназа активирует компоненты “внутреннего” (митохондриального) пути апоптоза [6], необходимым элементом которого является перфорация митохондриальных мембран. На более поздних стадиях апоптоза, запущенного по данному механизму, барьерную функцию теряет ЦПМ (рис. 3, Б, 4). Как следует из различий в полученных нами результатах флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, этот процесс сопровождается потерей клетками адгезивных свойств. Крайне незначительная доля клеток в популяции с перфорированной ЦПМ и сохранившими потен-

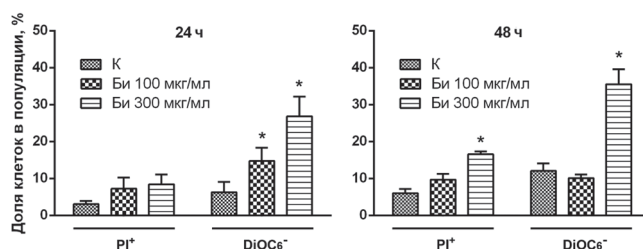


Рис. 2. Доля клеток с поврежденными мембранами в культуре клеток линии A549, включая клетки, потерявшие способность к адгезии (24 и 48 ч культивирования), по данным цитометрии. Общее количество клеток принято за 100%. PI⁺ – клетки с пермеабилizованной ЦПМ, DiOC₆⁻ – клетки с нарушенной митохондриальной мембраной. * – $p \leq 0,05$ в сравнении с вариантом без обработки РНКазой (K)

циал митохондриями, которая при всех вариантах обработки не превышала 1,5%, свидетельствует о том, что у биназы в исследованных концентрациях отсутствует способность индуцировать некроз клеток-мишеней.

Таким образом, в работе продемонстрировано нарушение нормального функционирования цитоплазматической мембраны и мембран митохондрий клеток аденокарциномы легких человека линии A549

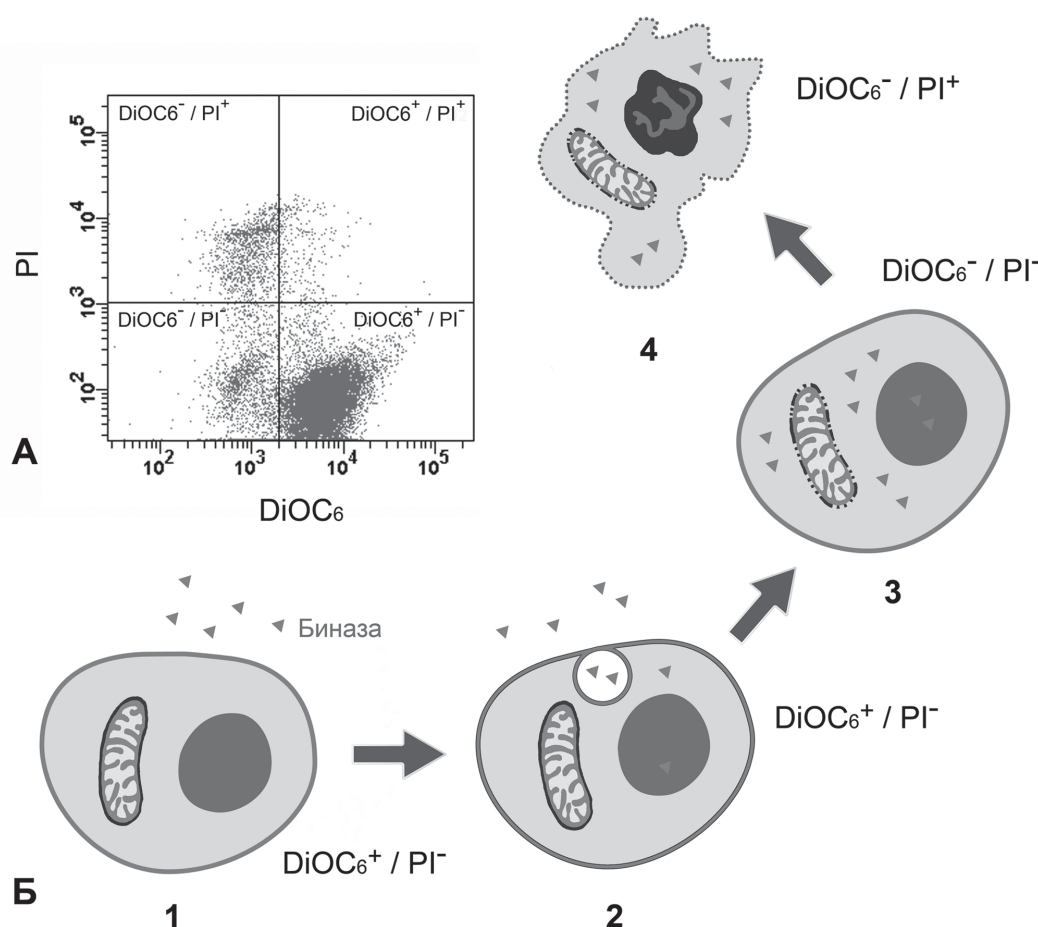


Рис. 3. Действие экзогенной биназы на клетки линии A549. А – цитометрическое распределение клеток, обработанных биназой (300 мкг/мл) в течение 48 ч. Б – этапы действия биназы: 1 – первичное взаимодействие фермента с клеткой; 2 – эндоцитоз, индуцированный биназой; 3 – ранний апоптоз; 4 – поздний апоптоз. Обозначения: клетки без повреждений мембран – DiOC₆⁺/PI⁻; с неповрежденной ЦПМ и нарушенной митохондриальной мембраной – DiOC₆⁻/PI⁻; с нарушением ЦПМ и митохондриальных мембран – DiOC₆⁻/PI⁺

под действием рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы) в различных концентрациях. Определена этапность влияния бактериальной РНКазы на мембранные структуры клеток-мишеней и выявлено, что вначале нарушения затрагивают мембраны митохондрий. Полученные результаты могут служить подтверждением того, что биназа индуцирует

преимущественно “внутренний” (митохондриальный) путь апоптоза клеток А549.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности К(П)ФУ и партнерского договора с университетом имени Ю. Либиха (Гиссен, Германия); поддержана грантом Российского научного фонда (проект №14-14-00522).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ardelt W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes // Curr. Pharm. Biotechnol. 2008. Vol. 9. N 3. P. 215–225.
2. Kao R., Davies J. Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? // Biochem. Cell. Biol. 1995. Vol. 73. N 11–12. P. 1151–1159.
3. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // FEBS J. 2011. Vol. 278. N 19. P. 3633–3643.
4. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE). induces human alveolar adenocarcinoma cell death // Toxicon. 2013. Vol. 69. P. 219–226.
5. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current // Toxicology. 2001. Vol. 156. N 2–3. P. 101–107.
6. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // Biochimie. 2013. Vol. 95. N 6. P. 1344–1349.
7. Zelenikhin P., Pukhovskaya V., Garipov A., Makeeva A., Sokolova, E., Ilinskaya O. Obvious and hidden reasons of breast cancer cell sensitivity to antitumor RNase // BioNanoScience. 2016. Vol. 6. N 4. P. 528–533.
8. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // Bioessays. 2008. Vol. 30. N 8. P. 781–790.
9. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // FEBS Lett. 2003. Vol. 540. N 1–3. P. 15–20.
10. Ilinskaya O.N., Karamova N.S., Ivanchenko O.B., Kipenskaya L.V. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases // Mut. Res. 1996. Vol. 354. N 2. P. 203–209.
11. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V., Dreyer F., Scholtz J.M., Pace C.N., Makarov A. RNase-induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels // Biochimie. 2008. Vol. 90. N 5. P. 717–725.
12. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease // FEBS Open Bio. 2016. Vol. 6. N 1. P. 24–32.
13. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE) // FEBS Lett. 1994. Vol. 354. N 3. P. 305–306.
14. Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2016. 728 pp.

Поступила в редакцию
09.10.2017

Принята в печать
12.12.2017

CELL BIOLOGY

BINASE INDUCED CHANGES OF TUMOR CELL MEMBRANES

P.V. Zelenikhin¹, A.S. Gorbunova¹, K. Beuerlein², A.V. Makeeva^{1,*}, O.N. Ilinskaya¹

¹Kazan Federal University, Kremlyovskaya st. 18, Kazan, 420008, Russia;

²Rudolf Buchheim Institute of Pharmacology, Justus-Liebig-University, Schubertstrasse 81, Giessen, 35392, Germany

*e-mail: avmakeeva.kpfu@gmail.com

Exogenous ribonuclease of bacilli can selectively induce apoptosis of malignant cells. The analysis of the ability of *Bacillus pumilus* ribonuclease — binase — to induce processes, which lead to a dynamic disruption of the integrity of A549 human adenocarcinoma cell membranes, was performed. The influence of different enzyme concentrations on the state of the cytoplasmic membrane of cells and mitochondrial membranes was characterized. Using the methods of flow cytometry and fluorescence microscopy, it has been established that binase leads to normal functioning disruption of both types of membranes, with mitochondrial membranes affected first. The study allowed to identify and visualize the effects of binase on the membrane structures of

target cells and to confirm that bacterial RNase induces apoptosis of target cells mainly through the “internal” (mitochondrial) pathway.

Keywords: *RNase, Bacillus pumilus, binase, antitumor activity, membranes disruption, lung adenocarcinoma A549*

Сведения об авторах

Зеленихин Павел Валерьевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-84; e-mail: pasha_mic@mail.ru

Горбунова Анна Сергеевна — магистрант кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-55; e-mail: gorbunovaanna94@gmail.com

Бойерляйн Кнут — науч. сотр. Института фармакологии им. Рудольфа Буххайма Университета Гиссена, Гиссен, Германия. Тел.: +49-0641-99-47601; e-mail: knut.beuerlein@pharma.med.uni-giessen.de

Макеева Анна Владимировна — вед. инженер НИЛ биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-55; e-mail: avmakeeva.kpfu@gmail.com

Ильинская Ольга Николаевна — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-55; e-mail: olga.ilinskaya@kpfu.ru

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 576.54

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА
НА ИММУНОСУПРЕССИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОКК.В. Зорникова^{1,2}, А.Н. Горностаева¹, Е.Р. Андреева^{1,*}¹Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское ш., д. 76А;²кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: andreeva1564@gmail.com

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) способны дифференцироваться в остео-, адипо- и хондронаправлениях, а также влиять на репарацию, регенерацию и иммунный ответ. Эти свойства, в особенности иммуносупрессия, делают МСК перспективным инструментом для клеточной терапии и регенеративной медицины. Краткосрочный гипоксический стресс, возникающий в поврежденных тканях, может негативно отразиться на способности МСК модулировать активность активированных мононуклеарных клеток периферической крови (МНК). В настоящей работе изучено влияние краткосрочного гипоксического воздействия (менее 1% кислорода) на иммуносупрессорный потенциал МСК, постоянно культивируемых при уровне кислорода, близком к тканевому (5%). При тканевом уровне кислорода среди находящихся в суспензии МНК в присутствии МСК было выявлено увеличение доли клеток врожденного иммунитета — естественных киллеров (ЕК) — и снижение процента клеток адаптивного иммунитета — Т-лимфоцитов HLA-DR⁺, а также показано существенное подавление пролиферации Т-клеток. Среди прикрепившихся МНК была выше доля моноцитов и ниже доля ЕК-Т-клеток. Краткосрочный гипоксический стресс не оказал влияния на способность МСК подавлять пролиферацию и активацию лимфоцитов в суспензии. Однако среди лейкоцитов, прикрепившихся к МСК, было отмечено уменьшение доли моноцитов и ослабление супрессии в отношении ЕК-Т-клеток. Таким образом, гипоксический стресс не влиял на иммуномодулирующую активность МСК в отношении находящихся в суспензии МНК. Снижение доли моноцитов, образующих прямые клеточные контакты с МСК, может негативно отразиться на формировании противовоспалительного фенотипа макрофагов. *In vivo* это может вызвать замедление “ответа на повреждение” при воспалении.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, мононуклеарные клетки периферической крови, гипоксия, иммуносупрессия, пролиферативная активность, межклеточные контакты

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделяемые из различных тканей, таких как жировая ткань, костный мозг, пульпа зуба и др., имеют значительный потенциал для регенеративной медицины и клеточной терапии [1]. Периваскулярные участки сосудистого русла рассматриваются как одно из основных депо МСК *in vivo* [2]. *In vitro* МСК активно пролиферируют и демонстрируют способность к мультилинейной дифференцировке по различным направлениям, включая адипо-, остео- и хондродифференцировку.

Особый интерес вызывает способность МСК продуцировать широкий спектр цитокинов и растворимых факторов, благодаря которым они оказывают влияние на иммунные клетки, модулируя их активность. Еще одним преимуществом этих клеток является низкая экспрессия белков главного комплекса гистосовместимости, что позволяет использовать их для аллогенной трансплантации [3].

In vitro при стандартных условиях культивирования (5% CO₂, 20% O₂) показано, что в присутствии МСК нестимулированные Т-лимфоциты лучше выживают и имеют больший пролиферативный потенциал, в то время как пролиферативная активность стимулированных Т-клеток подавляется [4]. МСК снижают способность Т-клеток секретировать провоспалительные цитокины, такие как интерферон-γ (interferon-γ, IFN-γ), фактор некроза опухоли-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) [5]. При этом МСК стимулируют секрецию интерлейкинов (interleukin, IL) IL-6 и IL-8 [6], а также противовоспалительного IL-10 [7, 8]. В случае В-клеток отмечено замедление деления и секреции иммуноглобулинов разных типов (IgA, IgM, IgG), а также снижение экспрессии рецепторов хемокинов (CXCR4, CXCR5, CCR7), приводящее к угнетению хемотаксиса клеток [9]. Взаимодействие МСК и естественных киллеров (ЕК) вызывает подавление пролифератив-

ной активности при совместном культивировании клеток в условиях атмосферного содержания кислорода (20%), однако этот эффект не наблюдается при 5% кислорода [10]. Взаимодействие МСК с моноцитами приводит к их дифференцировке в макрофаги со специфическим фенотипом, сходным с так называемым противовоспалительным фенотипом М2 макрофагов [11]. Они обладают высокой фагоцитарной активностью, высоким уровнем секреции противовоспалительного IL-10 и провоспалительного IL-6 и пониженным уровнем секреции провоспалительных IL-12 и TNF- α [12].

Для различных тканей организма, в том числе и для периваскулярных областей, характерна существенно более низкая, чем атмосферная, концентрация кислорода, которую сейчас принято обозначать как “физиологическая” гипоксия [13]. Низкое парциальное давление кислорода может существенным образом модифицировать свойства стромальных клеток. Постоянное культивирование МСК при концентрации кислорода, близкой к значениям в тканях (1–10%), сопровождается увеличением экспрессии основных генов стволовых клеток: Oct3/4, Sox2, Nanog. Повышение экспрессии данных маркеров указывает на то, что при тканевых значениях кислорода МСК обладают фенотипом некоммутированных клеток-предшественников. Это коррелирует с менее выраженной остео- и адипоиндукцией в гипоксических условиях [14, 15]. Таким образом, функциональная активность МСК в “естественной среде обитания”, в частности, реакция на острый гипоксический стресс, возникающий в участках повреждения тканей, может существенным образом отличаться от того, что можно ожидать на основании результатов, получаемых при изучении свойств МСК в стандартных лабораторных условиях (20% кислорода). Ранее в нашей лаборатории было показано, что МСК эффективно подавляют функциональную активность МНК при 5% кислорода: усиливается эффект подавления пролиферации активированных МНК при прямом контакте, ослабляется активация МНК по ранним маркерам активации CD69 и CD25 [8].

В настоящей работе мы исследовали влияние короткого гипоксического стресса (1% кислорода), сходного с возникающим в областях повреждения ткани, на иммуносупрессорные свойства МСК, постоянно культивируемых в условиях физиологической гипоксии (5% кислорода).

Материалы и методы

МНК получали из периферической крови здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности гистобака (Sigma–Aldrich, США; 1,077 г/л). Для культивирования МНК и совместного культивирования МСК и МНК использовали среду RPMI 1640 (Gibco, Великобритания), содержащую раствор антибиотика (пенициллин и стреп-

томицин, конечная концентрация которых в среде культивирования составляла 100 ед./мл и 100 мг/мл, соответственно) и эмбриональную телячью сыворотку (HyClone, США) в концентрации 10%. Для активации МНК использовали фитогемагглютинин (ФГА; Sigma, США).

МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека, которая была предоставлена многопрофильной клиникой “Союз” в рамках договора о научном сотрудничестве. Для получения первичной культуры МСК использовали ранее описанный метод [16] в модификации Буравковой и соавт. [14]. После выделения МСК сразу помещали в гипоксические условия (мультигазовый инкубатор Sanyo, Япония): 5% O₂, 5% CO₂, 37°C, влажность 100%. Полученные клетки проверяли на соответствие критериям МСК: способность к остео- и адиподифференцировке, экспрессию маркеров стромальных клеток CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии маркера гемопоэтических клеток CD45 (данные не представлены). Для экспериментов использовали МСК 4–5 пассажа, достигшие 70–80% монослоя. Часть клеток подвергали короткому гипоксическому воздействию – менее 1% кислорода, 24 ч в гипоксической камере (Stem Cell Technologies, Канада), оснащенной кислородным датчиком. К подвергшимся гипоксическому стрессу и к контрольным МСК добавляли активированные ФГА (10 мкг/мл) МНК. Совместное культивирование проводилось в течение 72 ч при 5% кислорода. В качестве контроля использовали ФГА-активированные МНК в монокультуре, также культивируемые при 5% кислорода. Схема эксперимента представлена на рисунке.

Анализ проводили в популяциях МНК, находящихся в суспензии, и МНК, прикрепившихся к МСК. МНК, прикрепившиеся к поверхности культуральных флаконов или к МСК, трипсинизировали для получения суспензии с помощью смеси растворов трипсина (0,5 г/л) и ЭДТА (0,2 г/л) (Sigma, США). Популяционный состав агранулярных лейкоцитов, субпопуляционный состав Т-клеток, их активацию и пролиферацию анализировали методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр BD Accuri C6; Beckman Dickenson, США).

Фенотипический анализ стромальных клеток проводили с применением флуорохромных конъюгатов моноклональных антител к следующим поверхностным маркерам: CD45, CD90, CD105, CD73 (BD Biosciences, США).

Для характеристики популяционного состава лейкоцитов и субпопуляций Т-клеток использовали панель моноклональных антител, оценивая долю CD3⁺(Т-клетки), CD3⁺/CD19⁺ (В-клетки), CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺ (ЕК-клетки), CD3⁺/CD4⁺ (Т-хелперы), CD3⁺/CD8⁺ (Т-супрессоры), CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺ (ЕК-Т-клетки), CD3⁺/HLA-DR⁺, CD3⁺/CD25⁺ (использовали антитела, меченные флуорохромами FITC или PE производства BD Biosciences, США).

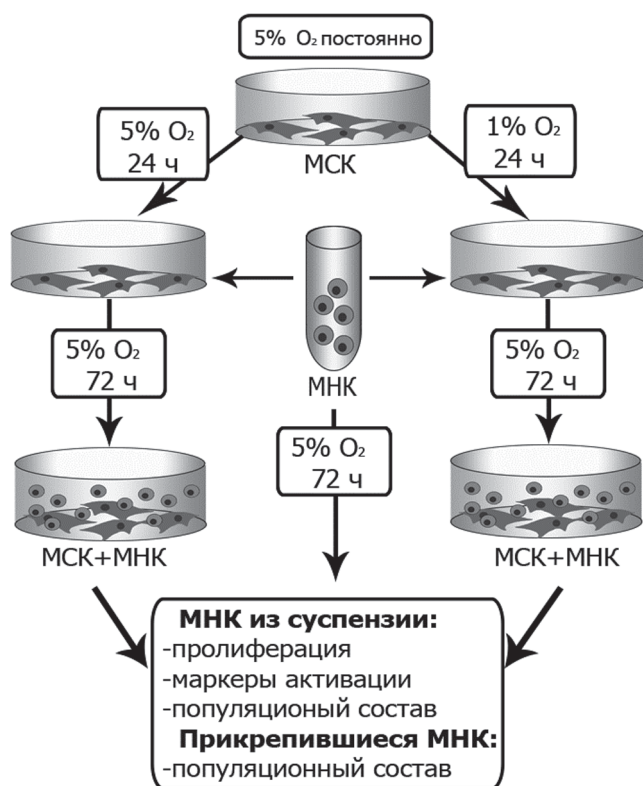


Рисунок. Схема эксперимента. Часть постоянно культивируемых при 5% кислорода мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (МСК) подвергали краткосрочному гипоксическому стрессу (24 ч, 1% кислорода). Активированные фитогемагглютинином мононуклеарные клетки (МНК) из периферической крови добавляли к МСК и совместно культивировали 72 ч при 5% кислорода. Находящиеся в суспензии МНК анализировали на пролиферативную активность, маркеры активации и популяционный состав. Прикрепившиеся МНК анализировали на популяционный состав

Пролиферацию лимфоцитов оценивали по интенсивности флуоресценции сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE; Invitrogen, США), которая уменьшается в два раза при каждом делении клетки [17].

В качестве характеристики полученных выборок использовали среднее значение и стандартное отклонение. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для малых и средних выборок, $n \leq 30$) при выбранном уровне значимости $p < 0,05$. Для каждого эксперимента было сделано три повторности.

Результаты и обсуждение

После совместного культивирования с МСК МНК были представлены двумя популяциями. Одна из них состояла из находящихся в суспензии клеток, а другая — из МНК, прикрепившихся к МСК.

Влияние краткосрочного гипоксического стресса на способность МСК подавлять пролиферацию и активацию находящихся в суспензии ФГА-активированных лимфоцитов. Взаимодействие с МСК оказало

значительное супрессивное действие на пролиферацию активированных МНК: доля поделившихся клеток за 3 сут в монокультуре составила $59 \pm 10\%$ против $4,8 \pm 2,1\%$ после совместного культивирования. Краткосрочный гипоксический стресс не повлиял на способность МСК подавлять пролиферацию МНК: доля поделившихся клеток составила $4,3 \pm 1,8\%$ от общего числа Т-клеток.

Подавление пролиферации в присутствии МСК связано с остановкой лимфоцитов в G_0 -фазе клеточного цикла вследствие подавления секреции циклина D2 [18]. При этом следует отметить, что важную роль в подавлении пролиферации играет непосредственный контакт Т-клеток и МСК [19].

Анализ популяционного состава ФГА-активированных МНК после взаимодействия с МСК выявил двукратное увеличение доли ЕК по сравнению с их долей в монокультуре ФГА-активированных МНК. Доля Т-клеток, несущих маркер поздней активации HLA-DR, уменьшилась более чем в 2 раза, а несущих маркер ранней активации ($CD25^+$) — не изменилась (табл. 1).

Краткосрочный гипоксический стресс не повлиял на способность МСК к подавлению пролиферации Т-клеток, несущих маркер поздней активации HLA-DR (табл. 1).

Влияние краткосрочного гипоксического стресса на способность МСК обеспечивать адгезию активированных МНК. Несмотря на то, что МСК могут влиять на клетки иммунной системы путем секреции цитокинов и растворимых факторов, во многих исследованиях показано усиление эффектов при непосредственном контакте клеток. А в некоторых случаях прямые контакты необходимы для осуществления иммуносупрессивных функций, например, для ЕК [20].

Для анализа популяционного и субпопуляционного состава МНК, прикрепившихся к МСК, было проведено иммуноцитохимическое окрашивание клеток, которое позволило выявить лейкоциты, среди которых были идентифицированы моноциты, ЕК, ЕК-Т-клетки, Т- и В-клетки.

Доля моноцитов была выше среди ФГА-активированных МНК, прикрепившихся к МСК, по сравнению с долей моноцитов в монокультуре ФГА-активированных МНК. Аналогичный эффект наблюдался и в отношении доли ЕК (табл. 2).

Культивирование МСК в условиях гипоксического стресса привело к ослаблению их способности подавлять пролиферацию ЕК-Т-клеток. Доля моноцитов, прикрепившихся к подвергнутым гипоксическому стрессу МСК, была ниже (табл. 2).

Влияние МСК на прикрепившиеся МНК может объясняться особенностями набора молекул, экспрессирующихся на поверхности МСК. Для МСК показана экспрессия молекул клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1, формирующих специфические межклеточные контакты и играющих

Таблица 1

Популяционный состав мононуклеарных клеток крови в суспензии после взаимодействия с МСК

Клеточная популяция	Процент клеток популяции среди МНК, культивировавшихся при 5% O ₂	Процент клеток популяции среди МНК, совместно культивировавшихся с МСК при 5% O ₂	Процент клеток популяции среди МНК, совместно культивировавшихся с МСК, после гипоксического стресса
В-клетки (CD3 ⁻ /CD19 ⁺)	7,05±2,25	8,75±1,8	9,2±0,8
Т-клетки (CD3 ⁺ /CD19 ⁻)	80,2±2,3	79,4±0,7	82,0±0,9
Естественные киллеры (CD3 ⁻ /56 ⁺ 16 ⁺)	3,3±0,8	7,1±1,5*	6,2±0,8*
Естественные киллеры -Т-клетки (CD3 ⁺ /56 ⁺ 16 ⁺)	4,7±2	6,1±0,5	7,7±1,6
Ранняя активация Т-клеток (CD3 ⁺ /CD25 ⁺)	86,7±3,7	76,06±9,3	82,7±5,5
Поздняя активация Т-клеток (HLA-DR ⁺)	18,8±2,1	8,5±0,1*	11,6±2*

Примечание: * — достоверное различие между МНК и МНК в совместной культуре с МСК (p<0,05).

Таблица 2

Популяционный состав мононуклеарных клеток крови, прикрепившихся к МСК

Клеточная популяция	Процент клеток популяции среди МНК, культивировавшихся при 5% O ₂	Процент клеток популяции среди МНК, совместно культивировавшихся с МСК при 5% O ₂	Процент клеток популяции среди МНК, совместно культивировавшихся с МСК после гипоксического стресса
В-клетки (CD3 ⁻ /CD19 ⁺)	6,9±1,1	6,2±0,4	6,2±0,5
Т-клетки (CD3 ⁺ /CD19 ⁻)	76,9±5,1	72,5±5	70,3±3,5
Естественные киллеры (CD3 ⁻ /56 ⁺ 16 ⁺)	3,9±0,8	7,0±0,5*	6,7±0,6*
Естественные киллеры -Т-клетки (CD3 ⁺ /56 ⁺ 16 ⁺)	4,7±0,8	2,5±0,4*	4,1±0,8
Моноциты (CD14 ⁺)	3,1±0,9	16,4±3,6*	10,2±1,3*

Примечание: * — достоверное различие между МНК и МНК в совместной культуре с МСК (p<0,05).

ключевую роль в иммуносупрессии Т-клеток [21]. Характерная для МСК экспрессия белков семейства B7 также определяет разнонаправленность воздействий, оказываемых на МНК. Так, например, белок B7-Н3 может оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие на Т-клетки [22]. Можно предположить, что краткосрочный гипоксический стресс подавляет экспрессию ICAM-1 на МСК, что обуславливает меньшую адгезию моноцитов. Недавно было показано, что именно прямые контакты между провоспалительными макрофагами М1 и МСК играют существенную роль в активации иммуносупрессорной активности МСК [23].

Таким образом, гипоксический стресс практически не оказывает влияние на выраженность и направление иммуномодулирующих свойств МСК в отношении находящихся в суспензии МНК. Ранее в нашей лаборатории было показано, что острый гипоксический стресс не влияет также и на другие морфологические и функциональные свойства МСК:

сохраняются жизнеспособность, морфология и мезенхимальный фенотип. После 24 ч гипоксического воздействия наблюдалось увеличение уровня экспрессии HIF-3α, ERK7, MEK1 и c-fos и снижение экспрессии MKK6, p53, CCNA2, CCNB1 и CCNB2. Значительно повышалась секреция фактора роста сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и IL-6 [24]. Эти данные позволяют предположить, что острая гипоксия не повлияет на функциональную активность МСК при их аллогенной трансплантации в области повреждения и воспаления. Однако ослабление способности моноцитов прикрепляться к МСК в условиях гипоксического стресса, а также увеличение доли ЕК среди находящихся в суспензии лимфоцитов может негативно влиять на последовательное развитие воспалительной реакции, снижая вклад МСК в процесс регенерации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-04-00942).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I.* Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine // *Exp. Mol. Med.* 2013. Vol. 45. e54.
2. *Murray I.R., West C.C., Hardy W.R., James A.W., Park T.S., Nguyen A., Tawonsawatruk T., Lazzari L., Soo C., Paul B.* Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. Vol. 71. N 8. P. 1353–1374.
3. *Jones B.J., McTaggart S.J.* Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic // *Exp. Hematol.* 2008. Vol. 36. N 6. P. 733–741.
4. *Benvenuto F., Ferrari S., Gerdoni E., Gualandi F., Frassoni F., Pistoia V., Mancardi G., Uccelli A.* Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25. N 7. P. 1753–1760.
5. *Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // *Blood.* 2002. Vol. 99. N 10. P. 3838–3843.
6. *Kronsteiner B., Wolbank S., Peterbauer A., Hackl C., Redl H., van Griensven M., Gabriel C.* Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells // *Stem Cells Dev.* 2011. Vol. 20. N 12. P. 2115–2126.
7. *Engela A.U., Baan C.C., Dor F.J., Weimar W., Hoogduijn M.J.* On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation // *Front. Immunol.* 2012. Vol. 3. 126.
8. *Gornostaeva A.N., Andreeva E.R., Buravkova L.B.* Human MMSC immunosuppressive activity at low oxygen tension: direct cell-to-cell contacts and paracrine regulation // *Human Physiology.* 2013. Vol. 39. N 2. P. 136–146.
9. *Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions // *Blood.* 2006. Vol. 107. N 1. P. 367–372.
10. *Krampera M., Cosmi L., Angeli R., Pasini A., Liotta F., Andreini A., Santarasci V., Mazzinghi B., Pizzolo G., Vinante F., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F.* Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* 2006. Vol. 24. N 2. P. 386–398.
11. *Kim J., Hematti P.* Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages // *Exp. Hematol.* 2009. Vol. 37. N 12. P. 1445–1453.
12. *Melief S.M., Geutskens S.B., Fibbe W.E., Roelofs H.* Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6 // *Haematologica.* 2013. Vol. 98. N 6. P. 888–895.
13. *Ivanovic Z.* Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm // *J. Cell Physiol.* 2009. Vol. 219. N 2. P. 271–275.
14. *Buravkova L.B., Grinakovskaya O.S., Andreeva E.R., Zhambalova A.P., Kozionova M.P.* Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under lower oxygen tension // *Cell Tiss. Biol.* 2009. Vol. 3. N 1. P. 23–28.
15. *Fotia C., Massa A., Boriani F., Baldini N., Granchi D.* Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells // *Cytotechnology.* 2015. Vol. 67. N 6. P. 1073–1084.
16. *Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* 2002. Vol. 13. N 12. P. 4279–4295.
17. *Parish C.R.* Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies // *Immunol. Cell Biol.* 1999. Vol. 77. N 6. P. 499–508.
18. *Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J., Lam E.W., Dazzi F.* Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells // *Blood.* 2005. Vol. 105. N 7. P. 2821–2827.
19. *Gornostaeva A., Andreeva E., Buravkova L.* Factors governing the immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro* // *Cytotechnology.* 2016. Vol. 68. N 4. P. 565–577.
20. *Ren G., Zhao X., Zhang L., Zhang J., L'Huillier A., Ling W., Roberts A.I., Le A.D., Shi S., Shao C., Shi Y.* Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184. N 5. P. 2321–2328.
21. *Hofmeyer K.A., Ray A., Zang X.* The contrasting role of B7-H3 // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. N 30. P. 10277–10278.
22. *Espagnolle N., Balguerie A., Arnaud E., Sensebé L., Varin A.* CD54-mediated interaction with pro-inflammatory macrophages increases the immunosuppressive function of human mesenchymal stromal cells // *Stem Cell Reports.* 2017. Vol. 8. N 4. P. 961–976.
23. *Andreeva E.R., Lobanova M.V., Udartseva O.O., Buravkova L.B.* Response of adipose tissue-derived stromal cells in tissue-related O₂ microenvironment to short-term hypoxic stress // *Cells Tissues Organs.* 2015. Vol. 200. N 5. P. 307–315.

Поступила в редакцию
14.11.2017

Принята в печать
15.12.2017

CELL BIOLOGY

THE EFFECT OF SHORT-TERM HYPOXIC STRESS ON IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY OF PERIVASCULAR MULTIPOTENT STROMAL CELLS

K.V. Zornikova^{1,2}, A.N. Gornostaeva¹, E.R. Andreeva^{1,}**¹Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,
Horoshevskoye sh. 76A, Moscow, 123007, Russia;**²Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: andreeva1564@gmail.com

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are stromal precursors with capacity to differentiate in osteo-, adipo-, and chondrodirections, participate in repair, regeneration and immune response. Those abilities, especially immunosuppression, make MSCs a perspective tool for cell therapy and regenerative medicine. Short-term hypoxic stress can occur in damaged tissues and negatively affect MSC capacities to modulate functions of activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In present paper, the impact of short-term hypoxic stress (<1% of oxygen) on immunosuppressive potential of tissue oxygen (5%) adapted MSCs was evaluated. At tissue oxygen level, we detected an increase of the ratio of innate immune cells (natural killers, NK) and a decrease of the ratio of adaptive immune cells (HLA-DR⁺ T-cells) within floating PBMCs in the presence of MSCs. Additionally, inhibition of T-cell proliferation was observed. Within adhered PBMCs the ratio of monocytes was higher and the ratio of NK-T-cells was lower. Short-term hypoxic stress did not affect MSC immunosuppression toward lymphocytes in suspension. Nevertheless, a decrease of percent of monocytes and NK-T-cells within adhered PBMCs was detected. Thus, hypoxic stress did not influence immunosuppressive activity of MSCs toward floating PBMCs. Attenuation of monocyte adhesion to MSCs upon cell-to-cell interaction may negatively impact on development of MSC-educated macrophages phenotype with anti-inflammatory activity. *In vivo* it may provoke slowdown of “response to injury” during inflammation.

Keywords: *mesenchymal stem cells, peripheral blood mononuclear cells, hypoxia, immunosuppression, proliferative activity, intercellular interactions*

Сведения об авторах

Зорникова Ксения Викторовна — студентка кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-195-15-73; e-mail: kse2574@yandex.ru

Горностаева Александра Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-15-73; e-mail: hindiii@yandex.ru

Андреева Елена Ромуальдовна — докт. биол. наук, ведущий науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-15-73; e-mail: andreeva1564@gmail.com

ГЕНЕТИКА

УДК 575.174

СОЗДАНИЕ ST/J/V-ГЕНОМ-СПЕЦИФИЧНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА
НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСОВ 5S-рДНК *THINOPYRUM*
BESSARABICUM, *PSEUDOROEGNERIA SPICATA* И *DASYPYRUM VILLOSUM*О.С. Александров^{1,*}, М.Г. Дивашук^{1,2}, Г.И. Карлов^{1,2}¹Центр молекулярной биотехнологии Российского государственного аграрного университета —
МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49;²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Нетранскрибируемые спейсеры (non-transcribed spacers, NTS) 5S-рДНК часто являются полиморфными у достаточно близких видов и даже внутри одного генома. У представителей трибы Triticeae — *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata* и *Dasyphyrum villosum* — был выявлен полиморфизм по NTS 5S-рДНК между геномами St, J и V. На основе данного полиморфизма была осуществлена разработка молекулярно-генетического маркера, позволяющего идентифицировать эти три генома. Пара праймеров была подобрана к последовательностям консервативных областей NTS 5S-рДНК данных геномов. Длина амплифицируемого фрагмента составила 158 п.о. для V-генома, 171 п.о. для St-генома и 172 п.о. для J-генома. Фрагменту St-генома также свойственно наличие сайта узнавания для эндонуклеазы рестрикции SmaI, что позволяет отличать его от фрагмента J-генома, в котором этот сайт отсутствует. Разработанный маркер показал высокую эффективность при верификации образцов коллекции и изучении аллополиплоидов.

Ключевые слова: 5S-рДНК, нетранскрибируемые спейсеры, St-геном, J-геном, V-геном, молекулярный маркер

Одна из трех молекул, образующих большую субъединицу рибосом растительных и большинства животных организмов, — 5S рРНК — кодируется генами, которые входят в состав tandemно повторяющихся мономеров [1]. Кроме консервативной 120-нуклеотидной кодирующей части в состав мономеров входят нетранскрибируемые спейсеры (non-transcribed spacers, NTS), которым часто свойствен полиморфизм по длине и нуклеотидному составу даже у достаточно близких таксонов. Межвидовой полиморфизм NTS 5S-рДНК эффективно использовался для видовой характеристики в таких семействах, как Brassicaceae, Pinaceae, Poaceae, Solanaceae и др. [2–6]. К тому же был предложен метод PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction — Restriction Fragment Length Polymorphism), с помощью которого данный полиморфизм эффективно маркировался [7].

Триба Triticeae включает в себя около 500 видов однолетних и многолетних трав, среди которых очень важны такие сельскохозяйственные культуры, как пшеница (*Triticum aestivum* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и рожь (*Secale cereale* L.) [8]. Кроме того, в ней имеются дикорастущие сородичи данных культур, которые все чаще используются в качестве доноров для обогащения генофонда этих культур полезными генами, например, генами устойчивости к болезням [9]. Поэтому большое внимание уделяется изучению таких видов, как *Thinopyrum bessarabicum*

(Savul. & Rayss) A. Love (J-геном, $2n=2x=14$), *Th. intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey (J^JSt, $2n=6x=42$), *Th. ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (JJJJ^J, $2n=10x=70$), *Pseudoroegneria spicata* (Pursh) A. Love (St-геном, $2n=2x=14$) и *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy (V-геном, $2n=2x=14$) [9–13]. Явная недостаточность различий по морфологическим признакам привела к тому, что при построении классификации представителей трибы Triticeae стали активно использовать цитологические методы, которые достаточно трудоемки и требуют значительных затрат времени. В связи с этим имеется потребность в быстрых и простых методах идентификации геномов Triticeae. В последнее время для этой цели все чаще используют молекулярные маркеры [14–19].

В данной работе предлагается новый, разработанный на основе полиморфизма NTS 5S-рДНК, молекулярный маркер, с помощью которого возможна идентификация St-, J- и V-геномов у представителей трибы Triticeae.

Материалы и методы

В работе использовались образцы представителей трибы Triticeae, выращенные в теплице из семян, предоставленных банком генетических ресурсов USDA: *Th. bessarabicum* (J, номер W6 21717, $2n=2x=14$), *Th. intermedium* (J^JSt, номера PI 401200,

PI 249146, PI 578695, 2n=6x=42), *Th. ponticum* (JJJJ^sJ^s, номера PI 383583, PI 547313, PI 636523, 2n=10x=70), *Ps. spicata* (St, номера PI 635993, 2n=2x=14; PI 537371, 2n=4x=28), *D. villosum* (V, номера PI 470279, PI 598390, W6 21717, 2n=2x=14). ДНК выделяли из молодых листьев по методике, описанной ранее [20]. Анализ последовательностей NTS 5S-рДНК проводили с использованием программного обеспечения GenDoc [21] и NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Подбор праймеров осуществляли с помощью сервиса Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе C1000 Touch™ ThermalCycler (Bio-Rad, США) при следующих параметрах: 1) 94°C – 5 мин; 2) 30 циклов (94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с); 3) 72°C – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2,5%-ном агарозном геле при 5 В/см и фотографировали с помощью системы гель-документации GelDoc XR+ (Bio-Rad, США). Для гидролиза эндонуклеазой рестрикции SmiM I отбирали 8 мкл ПЦР-продукта каждого образца, добавляли 1 мкл фермента (10 ед.) и 1 мкл 10-кратного буфера W (10 mM Tris-HCl (pH 8,5 при 25°C); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM DTT (Dithiotreitol, дитиотреитол)). Гидролиз проводили при температуре 37°C в течение 8 ч. Продукты рестрикции разделяли в 2,5%-ном агарозном геле при 2 В/см в течение 1 ч и при 5 В/см в течение 1 ч 30 мин.

Результаты и обсуждение

Для поиска консервативных и полиморфных участков NTS 5S-рДНК были использованы последовательности GenBank: KC188601, KC188604, KC188607, KX235540, KX235542-KX235544 – для *Th. bessarabicum*; AF550698, EU093290-EU093298 – для *Ps. spicata*; KC188405-KC188413, KC188416-KC188432, KC188434-KC188447, KC894632- KC894636, KF483134, KF483135 – для *D. vilosum*. Для каждого вида было проведено выравнивание NTS и получены консенсусные последовательности. Далее проводили их выравнивание (рис. 1, А). Картина выравнивания продемонстрировала значительное сходство между NTS изучаемых геномов: 91% для St- и J-геномов, 80% для St- и V-геномов и 81% для J- и V-геномов. Однако были обнаружены и полиморфные участки длиной от 1 до 15 п.о. Один из таких участков (“259...274” по картине выравнивания, рис. 1, А) отсутствовал в NTS V-генома. Полиморфный участок “317...323” отличался у NTS всех трех геномов. Сравнение рестрикционных карт NTS, полученных с помощью программы NEBcutter V2.0, позволило подобрать эндонуклеазу рестрикции для визуального выявления данного полиморфизма (рис. 2). Фермент SmiM I с сайтом узнавания CAYNN↑NNRTG производит гидролиз NTS St-генома между нуклеотидами 320 и 321, а NTS J- и V-геномов не гидролизуются данным ферментом.

Чтобы найденный полиморфный локус можно было использовать в практических экспериментах,

была подобрана пара праймеров к последовательностям консервативных участков NTS изучаемых геномов (StJV-f: 5'-CGTGTTGCTGCGGTATAGAG-3', StJV-r: 5'-GTCCCTTATGCTTGCCACTC-3'), позволяющая амплифицировать фрагмент, включающий данный полиморфный локус (рис. 1, А). ПЦР с подобранными праймерами продемонстрировала амплификацию целевых продуктов ожидаемой длины для всех геномов (таблица) и наглядно показала отличие по длине амплифицируемого фрагмента V-генома от фрагментов St- и J-генома, как и было предсказано по картине выравнивания (рис. 1, А). Помимо целевых фрагментов в качестве минорных компонентов профиля также присутствовали фрагменты, амплифицируемые с соседних мономеров tandemно организованных массивов 5S-рДНК (рис. 1, Б, В). Обработка ПЦР-продуктов эндонуклеазой рестрикции SmiM I показала отсутствие гидролиза внутри фрагментов V- и J-геномов, а также наличие гидролиза целевого фрагмента St-генома на два фрагмента длиной 32 п.о. и 139 п.о. (рис. 1, В). Минорные фрагменты, амплифицируемые с соседних мономеров, более не наблюдались в профиле, так как были гидролизованы SmiM I на фрагменты длиной 32, 139 и 480 п.о. Кроме того, в профиле продуктов рестрикции наблюдалось присутствие фрагмента, соответствующего длине негидролизованного целевого фрагмента. Анализ отдельных NTS 5S-рДНК St-генома (например, NTS из последовательностей EU093290, EU093292 и др.) показал, что среди них имеется небольшая фракция, несущая мутации в сайте рестрикции SmiM I, что и привело к наличию данного фрагмента в профиле продуктов гидролиза. В целом, наличие фрагментов длиной 32, 139 и 480 п.о. в профиле продуктов рестрикции St-генома позволяет достаточно эффективно отличать его от профиля J-генома.

Таблица

Длины фрагментов, амплифицируемых с использованием праймеров StJV-f/StJV-r, и продуктов их гидролиза эндонуклеазой рестрикции SmiM I на трех видах: *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata* и *D. villosum*

Вид	Длина ампликона, п.о.	Длина фрагментов после гидролиза SmiM I, п.о.	
<i>Th. bessarabicum</i> (J-геном)	172	172	
<i>Ps. spicata</i> (St-геном)	171	139	32
<i>D. villosum</i> (V-геном)	158	158	

Помимо диплоидных видов *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata* и *D. vilosum*, содержащих только один из рассматриваемых геномов, с помощью разработанного маркера были изучены и аллополиплоидные виды *Th. ponticum* (2n=10x=70, JJJJ^sJ^s) и *Thinopy-*

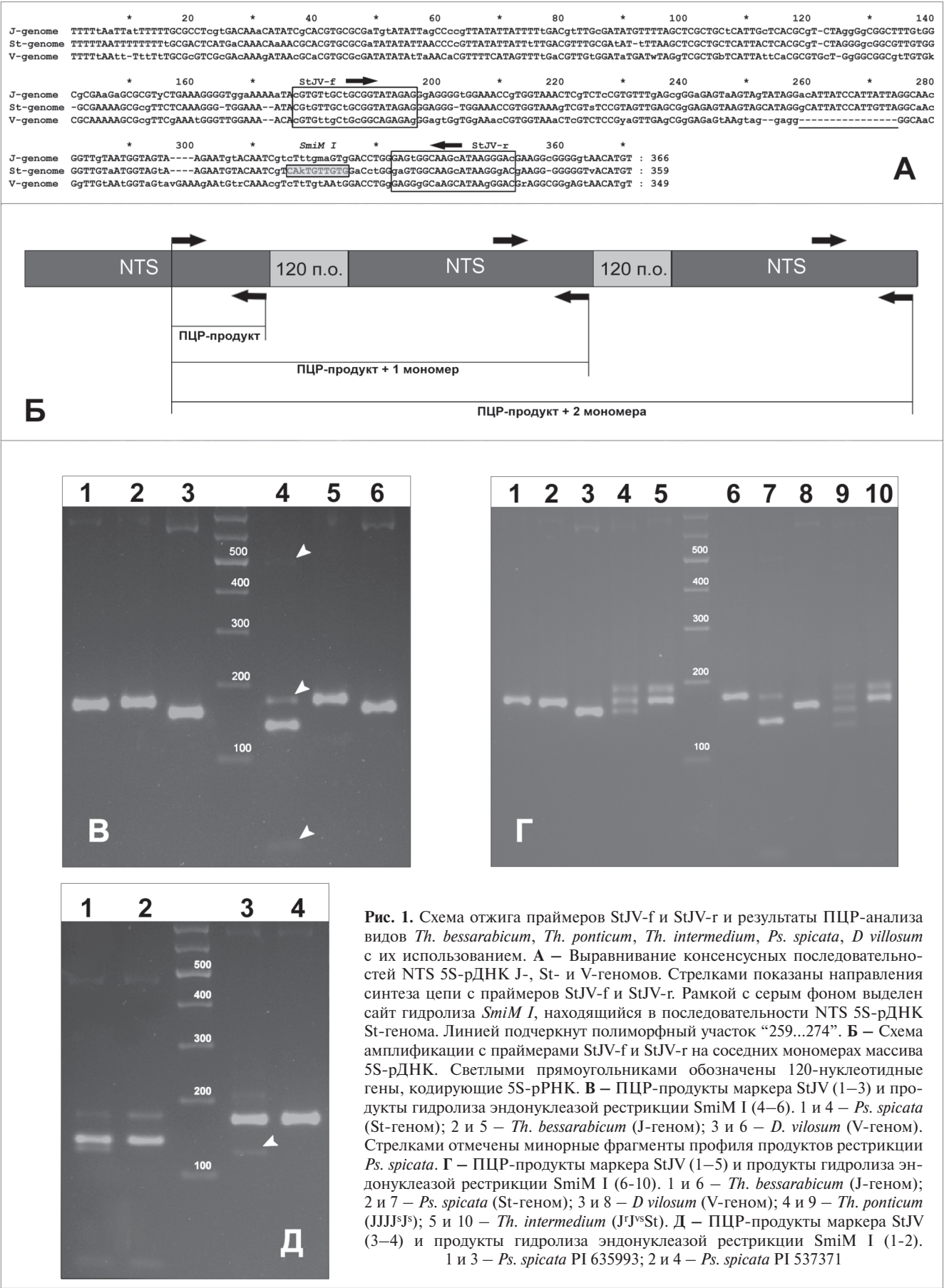


Рис. 1. Схема отжига праймеров StJV-f и StJV-r и результаты ПЦР-анализа видов *Th. bessarabicum*, *Th. ponticum*, *Th. intermedium*, *Ps. spicata*, *D. villosum* с их использованием. **А** – Выравнивание консенсусных последовательностей NTS 5S-рДНК J-, St- и V-геномов. Стрелками показаны направления синтеза цепи с праймеров StJV-f и StJV-r. Рамкой с серым фоном выделен сайт гидролиза *SmiM I*, находящийся в последовательности NTS 5S-рДНК St-генома. Линией подчеркнут полиморфный участок “259...274”. **Б** – Схема амплификации с праймерами StJV-f и StJV-r на соседних мономерах массива 5S-рДНК. Светлыми прямоугольниками обозначены 120-нуклеотидные гены, кодирующие 5S-рРНК. **В** – ПЦР-продукты маркера StJV (1–3) и продукты гидролиза эндонуклеазой рестрикции *SmiM I* (4–6). 1 и 4 – *Ps. spicata* (St-геном); 2 и 5 – *Th. bessarabicum* (J-геном); 3 и 6 – *D. vilosum* (V-геном). Стрелками отмечены минорные фрагменты профиля продуктов рестрикции *Ps. spicata*. **Г** – ПЦР-продукты маркера StJV (1–5) и продукты гидролиза эндонуклеазой рестрикции *SmiM I* (6–10). 1 и 6 – *Th. bessarabicum* (J-геном); 2 и 7 – *Ps. spicata* (St-геном); 3 и 8 – *D. vilosum* (V-геном); 4 и 9 – *Th. ponticum* (JJJJSt); 5 и 10 – *Th. intermedium* (JStSt). **Д** – ПЦР-продукты маркера StJV (3–4) и продукты гидролиза эндонуклеазой рестрикции *SmiM I* (1–2). 1 и 3 – *Ps. spicata* PI 635993; 2 и 4 – *Ps. spicata* PI 537371

rum intermedium ($2n=6x=42$, $J^{vs}J^{st}$). *Th. ponticum* содержит рекомбинантный J^{st} -геном, возникший при участии St -генома [22]. *Th. intermedium* помимо рекомбинантного J^{vs} -генома, возникшего при участии V - и St -генома, содержит ещё полностью St -геном [23, 24].

Профиль ПЦР-продуктов *Th. ponticum* отличался от профилей *Th. bessarabicum* и *Ps. spicata* тем, что помимо целевого 172-нуклеотидного фрагмента и минорных фрагментов, амплифицируемых с соседних мономеров, содержал фрагмент около 190 п.о. (рис. 1, Г). После гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Smi* I кроме характерных для J -генома негидролизованых фрагментов ПЦР-продукта в профиле наблюдались минорные фрагменты 32, 139 и 480 п.о., характерные для St -генома. Их появление можно объяснить тем, что в рекомбинантном J^{st} -геноме *Th. ponticum* присутствуют NTS 5S-рДНК St -генома.

Профиль ПЦР-продуктов *Th. intermedium* помимо целевого 172-нуклеотидного фрагмента и соответствующих J - и St -геномам минорных фрагментов, амплифицируемых с соседних мономеров, содержал ещё два разных по длине фрагмента (рис. 1, Г). Один из них — такой же, как и у *Th. ponticum* фрагмент, длиной 190 п.о. А другой — это 158-нуклеотидный целевой фрагмент, характерный для V -генома. Источником этого дополнительного фрагмента являются NTS 5S-рДНК V -генома, присутствующие в рекомбинантном J^{vs} -геноме. После гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Smi* I кроме описанных фрагментов ПЦР-продуктов J - и V -геномов в профиле появились характерные для рестрикционного профиля St -генома фрагменты длиной 32, 139 и 480 п.о.

Кроме анализа аллополиплоидов разработанный маркер может эффективно применяться и

при верификации образцов представителей трибы Triticeae. Для подтверждения этого утверждения был проведен эксперимент с образцом *Ps. spicata* PI 537371, который изучался в работе Кхуат и соавт. [25]. С помощью методов цитогенетики они показали, что данный образец не является диплоидным видом *Ps. spicata*, а представляет собой аллотетраплоид, содержащий помимо St -генома ещё целый геном неизвестного происхождения. Профиль ПЦР-продуктов PI 537371 помимо характерных для St -генома целевого 171-нуклеотидного фрагмента и минорных фрагментов, амплифицируемых с соседних мономеров, содержал ещё фрагмент длиной около 120 п.о. (рис 1, Д), то есть отличие от настоящей *Ps. spicata* наблюдалось уже на этапе ПЦР-продукта. Присутствие в PI 537371 St -генома подтвердилось наличием в профиле продуктов рестрикции характерных для него фрагментов длиной 32, 139 и 480 п.о.

Таким образом, на основе полиморфизма NTS 5S-рДНК был создан молекулярный ДНК-маркер, с высокой эффективностью идентифицирующий геномы St , J и V трибы Triticeae. Данный маркер является весьма перспективным инструментом, который может применяться для анализа и верификации образцов создаваемых коллекций видов Triticeae, быстрого скрининга материала для гербариев и депозитариев живых систем (например, депозитарий “Ноев ковчег”, <http://depository.msu.ru>), а также в селекционном улучшении пшеницы с привлечением ее дикорастущих сородичей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 16-16-00097 “Геномный и молекулярно-цитогенетический анализ дикорастущих злаков трибы Triticeae с целью рационального привлечения их генетического потенциала в селекции пшеницы”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wicke S., Costa A., Muñoz J., Quandt D. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. Vol. 61. N 2. P. 321–332.
2. Yang Y.W., Tseng P.F., Tai P.Y., Chang Ch.J. Phylogenetic position of *Raphanus* in relation to *Brassica* species based on 5S rRNA spacer sequence data // Bot. Bull. Acad. Sin. 1998. Vol. 39. N 3. P. 153–160.
3. Brown G.R., Carlson J.E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s-5.8s-26s rRNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*) // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 95. N 1–2. P. 1–9.
4. Liu Z.L., Zhang D., Wang X.Q., Ma X.F., Wang X.R. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines // Am. J. Bot. 2003 Vol. 90. N 1. P. 17–24.
5. Matyáček R., Fulneček J., Lim K.Y., Leitch A.R., Kovarik A. Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae) // Genome. 2002. Vol. 45. N 3. P. 556–562.
6. Baum, B.R., Edwards, T., Johnson, D.A. Codependence of repetitive sequence classes in genomes: phylogenetic analysis of 5S rDNA families in *Hordeum* (Triticeae: Poaceae) // Genome. 2010. Vol. 53. N 3. P. 180–202.
7. Berteaux C.M., Gnani G. Restriction fragment length polymorphism of the 5S-rRNA-NTS region: a rapid and precise method for plant identification // Plant DNA fingerprinting and barcoding. Methods in molecular biology. Vol. 862. / Eds. N. Sucher, J. Hennell, and M. Carles. 2012. P. 89–101.
8. Middleton C.P., Senerchia N., Stein N., Akhunov E.D., Keller B., Wicker T., Kilian B. Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. N 3. e85761.
9. Kroupin P.Y., Divashuk M.G., Belov V.I., Glukhova L.I., Aleksandrov O.S., Karlov G.I. Comparative molecular cytogenetic characterization of partial wheat-

- wheatgrass hybrids // Russ. J. Genet. 2011. Vol. 47. N 4. P. 432–437.
10. Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Y., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // Euphytica. 2015. Vol. 204. N 1. P. 91–101.
 11. Divashuk M.G., Khuat T.M.L., Kroupin P.Yu., Kirov I.V., Romanov D.V., Kiseleva A.V., Khrustaleva L.I., Alexeev D.G., Zelenin A.S., Klimushina M.V., Razumova O.V., Karlov G.I. Variation in copy number of Ty3/Gypsy centromeric retrotransposons in the genomes of *Thinopyrum intermedium* and its diploid progenitors // PLoS ONE. 2016. Vol. 11. N 4. e0154241.
 12. Kocheshkova A.A., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Pochtovyy A.A., Upelnik V.P., Belov V.I., Divashuk M.G. Pre-harvest sprouting resistance and haplotype variation of *ThVp-I* gene in the collection of wheat-wheatgrass hybrids // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. N 11. e0188049.
 13. Sibikeev S.N., Badaeva E.D., Gulyaeva E.I., Druzhin A.E., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of Agropyron intermedium (Host) Beauv 6Agi and 6Agi2 chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat-wheatgrass substitutions // Russ. J. Genet. 2017. Vol. 53. N 3. P. 314–324.
 14. Löve A. Conspectus of the Triticeae // Fedd. Report. 1984. Vol. 95. N 7–8. P. 425–521.
 15. Okito P., Mott I.W., Wu Y., Wang R.R.C. A Y genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae) // Genome. 2009. Vol. 52. N 4. P. 391–400.
 16. Wei J.Zh., Wang R.R.C. Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses // Genome. 1995. Vol. 38. N 6. P. 1230–1236.
 17. Li X.M., Lee B.S., Mammadov A.C., Koo B.C., Mott I.W., Wang R.R.C. CAPS markers specific to E^b, E^c and R genomes in the tribe Triticeae // Genome. 2007. Vol. 50. N 4. P. 400–411.
 18. Hu L., Li G., Zhan H., Liu C., Yang Z. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat-*Thinopyrum intermedium* derivative lines // J. Genet. 2014. Vol. 93. N 1. P. 69–74.
 19. Zhang J., Long H., Pan Z., Liang J., Yu S., Deng G., Yu M. Characterization of a genome-specific Gypsy-like retrotransposon sequence and development of a molecular marker specific for *Dasypyrum villosum* (L.) // J. Genet. 2013. Vol. 92. N 1. P. 103–108.
 20. Doyle J.J., Doyle J.L., Hortoriun L.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. N 1. P. 13–15.
 21. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation [Электронный ресурс]. 1997. URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm> (дата обращения: 21.11.2017).
 22. Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Thomas J.B. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization // Genome. 1998. Vol. 41. N 4. P. 580–586.
 23. Mahelka V., Kopecký D., Pařtová L. On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae) // BMC Evol. Biol. 2011. Vol. 11. N 1. 127.
 24. Deng C.L., Bai L.L., Fu S.L., Yin W.B., Zhang Y.X., Chen Y.H., Wang R.R.C., Zhang X.Q., Han F.P., Hu Z.M. Microdissection and chromosome painting of the alien chromosome in an addition line of wheat-*Thinopyrum intermedium* // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. N 8. e72564.
 25. Khuat Th.M.L., Divashuk M.G., Kroupin P.Yu., Nguyen P.A., Kiseleva A.V., Karlov G.I. Differences in ploidy level and genome constitution revealed by cytogenetic analysis of *Pseudoroegneria* germplasm accessions: case study // Известия ТСХА. 2015. № 2. С. 29–35.

Поступила в редакцию
23.11.2017

Принята в печать
14.12.2017

GENETICS

DEVELOPMENT OF THE ST/J/V GENOME SPECIFIC MOLECULAR MARKER BASED ON 5S rDNA POLYMORPHISM IN *THINOPYRUM BESSARABICUM*, *PSEUDOROEGNERIA SPICATA* AND *DASYPYRUM VILLOSUM*

O.S. Alexandrov^{1,*}, M.G. Divashuk^{1,2}, G.I. Karlov^{1,2}

¹Centre for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st. 49, Moscow, 127550, Russia;

²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology
Timiryazevskaya st. 42, Moscow, 12755, Russia

*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Non-transcribed spacers (NTS) of 5S rDNA are often polymorphic in closely related species and even in the same genome. The polymorphism of 5S rDNA NTS was shown between genomes St, J and V of Triticeae species *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata*, and *Dasypyrum villosum*, respectively. A molecular genetic marker was designed based on the 5S

rDNA NTS polymorphism that allows identification of the St, J and V genomes. We designed a pair of primers that correspond to the conserved regions of 5S rDNA NTS between the genomes studied. The PCR amplicon length is 158 bp for V, 171 bp for St and 172 bp for J genome. The fragment of St genome is characterized by *SmiI* restriction site that enables its differentiation from J genome fragment that lacks this site. The developed marker showed its efficiency for verification of germplasm accessions and the study of allopolyploids.

Keywords: 5S rDNA, non-transcribed spacers, St genome, J genome, V genome, molecular marker

Сведения об авторах

Александров Олег Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: olegsandrov@gmail.com

Дивашук Михаил Георгиевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева, зав. лаб. диагностики патогенов растений. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: divashuk@gmail.com

Карлов Геннадий Ильич — докт. биол. наук, проф., член-корр. РАН, и. о. директора Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии, руководитель Центра молекулярной биотехнологии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: karlovg@gmail.ru

МЕТОДЫ

УДК 576.535:57.089.67

ФОТООТВЕРЖДАЕМЫЕ ГИДРОГЕЛИ, СОДЕРЖАЩИЕ СПИДРОИН
ИЛИ ФИБРОИН

И.В. Бессонов¹, М.С. Котлярова^{1,*}, М.Н. Копицына¹, А.В. Федулов²,
А.М. Мойсенович¹, А.Ю. Архипова³, В.Г. Богущ⁴, Д.В. Багров¹,
А.А. Рамонова³, А.Е. Машков², К.В. Шайтан¹, М.М. Мойсенович³

¹Кафедра биоинженерии и ³лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корп. 1;

⁴Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Получены биосовместимые фотоотверждаемые гидрогели, состоящие из метакрилированного желатина и белков шелка (рекомбинантного аналога спidroина каркасной нити паутины *Nephila clavipes* и фиброина шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*). Данные полимеры характеризуются высокой биосовместимостью и способностью к биodeградации, что обуславливает возможность их применения в тканевой инженерии. Гидрогели были изготовлены двумя способами, позволяющими получать либо изделия большого размера, либо микроструктуры заданной формы. Для изготовления объемных гидрогелей образцы фотополимеризовали в свете ультрафиолетовой лампы в течение 10 мин. В результате были получены образцы гидрогелей, представляющие собой диски диаметром 13 мм. Методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что они обладают пористой структурой. Микроструктуры были сформированы на покровном стекле с использованием лазера с длиной волны 405 нм микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония). Данный подход позволяет контролировать топографические особенности получаемых субстратов, он применим для создания микроструктурированных поверхностей, которые могут быть использованы для изучения взаимодействия клеток с субстратом.

Ключевые слова: гидрогели, фотополимеризация, спidroин, фиброин, тканевая инженерия, метакрилированный желатин

Фотоотверждаемые материалы затвердевают при облучении светом определенной области спектра. Их использование в биомедицинских исследованиях представляет интерес как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте. Так, они могут являться основой микроструктурированных поверхностей с контролируемой топографией и распределением лигандов для клеточных рецепторов, что позволяет моделировать различные биологические процессы, например, рост аксонов [1]. Также фотоотверждение лежит в основе ряда аддитивных технологий, позволяющих создавать трехмерные структуры с субмикронной точностью позиционирования [2].

Одной из наиболее востребованных областей применения фотоотверждаемых материалов является получение скаффолдов для тканевой инженерии, направленной на поиск эффективных подходов к восстановлению повреждений в различных тканях и органах. Скаффолды играют роль искус-

ственного внеклеточного матрикса, на основе которого формируется ткань, поэтому большое значение имеет материал, из которого они состоят.

Метакрилированный желатин является фотоотверждаемым материалом, который широко используется для различных биомедицинских приложений вследствие его нетоксичности, биodeградируемости и возможности контролировать его свойства [3]. Однако даже химически сшитые гидрогели, сформированные из этого полимера, не обладают необходимыми механическими свойствами, а также имеют высокие коэффициент набухания и скорость биodeградации. Один из подходов к решению этой проблемы был предложен ранее: в водный раствор метакрилированного желатина перед проведением фотополимеризации добавляли небольшие количества (5–20%) фиброина шелка [4]. В результате получали гидрогели, обладающие структурой взаимопроницающих сеток. В их состав входят химически сшитый по двойным связям C=C-полимер

на основе метакрилированного желатина и физически сшитый благодаря формированию бета-структур фиброин шелка. Такой состав обеспечивает лучшие механические и технологические характеристики получаемого биоматериала по сравнению с однокомпонентными аналогами.

Структурные белки шелка, к которым относится фиброин, обладают всеми свойствами, необходимыми для применения в тканевой инженерии, а также характеризуются уникальной для природных полимеров прочностью и эластичностью. Особенно интересна возможность использования белков паутины — спидроинов. Ранее было показано, что имплантация сформированных из рекомбинантного спидроина пористых скаффолдов в область дефекта бедренной кости крысы приводит к значительному ускорению регенерации по сравнению с регенерацией незаполненного дефекта бедренной кости, а также регенерацией дефекта при имплантации фиброинового скаффолда [5].

Целью данной работы являлось получение фотоотверждаемых гидрогелей на основе метакрилированного желатина и структурных белков шелка — рекомбинантного аналога спидроина каркасной нити паутины *Nephila clavipes* и фиброина шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*.

Материалы и методы

Материалы. Метакриловый ангидрид (94%), оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%), диметилсульфоксид (99,9%) и бромид лития (99%) (Sigma-Aldrich, Германия), муравьиная кислота (99%) (Acros Organic, США), этанол (95%) (Медхимпром, Россия), желатин кристаллический (особо чистый, Carl Roth, Германия), среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM, ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), параформальдегид (Sigma-Aldrich, Германия), краситель SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen, США), хирургические шелковые нити (ООО «Моснитки», Россия), рекомбинантный аналог спидроина 1F9, полученный по описанной ранее методике [6], 0,1 М калий-фосфатный буферный раствор (pH 7,2).

Синтез метакрилированного желатина. Навеску кристаллического желатина (1 г) помещали в круглодонную колбу, оснащенную магнитной мешалкой, и добавляли 20 мл 0,1 М калий-фосфатного буферного раствора (pH 7,2). Растворение желатина производили на водяной бане (50°C) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Итоговая концентрация составляла 5 мас.%. В полученный раствор вносили избыток метакрилового ангидрида. Реакцию проводили в течение 3 ч при

постоянном перемешивании и нагревании (50°C). Далее к реакционной смеси добавляли 20 мл 0,1 М калий-фосфатного буферного раствора (pH 7,2), после чего охлаждали смесь до комнатной температуры и очищали диализом в целлюлозных мембранах против двадцатикратного объема дистиллированной воды при постоянном перемешивании на магнитной мешалке со сменой каждый час в течение 3 сут до исчезновения запаха метакрилового ангидрида. Продукт реакции переносили в чашку Петри, замораживали при –18°C и лиофилизировали на приборе Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) до постоянной массы.

Получение водного раствора фиброина шелка. Навеску хирургических шелковых нитей растворяли в 9,3 М растворе бромида лития, затем диализовали против дистиллированной воды в течение суток с десятью сменами воды. Раствор фиброина замораживали в чашках диаметром 10 см и лиофилизировали на приборе Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия). Необходимую для получения раствора с нужной концентрацией массу белка растворяли в дистиллированной воде.

Формирование гидрогелей. Для изготовления гидрогелей на основе фиброина навеску метакрилированного желатина растворяли в диметилсульфоксиде в термощкафу при температуре 50–60°C до его полного растворения и добавляли фотоинициатор оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%, 3 мас.% по метакрилированному желатину). Далее аккуратно при перемешивании приливали водный раствор фиброина. Концентрация метакрилированного желатина в итоговом растворе составляла не менее 3 мас.%, а соотношение мономеров (метакрилированный желатин:фиброин) — 2:1.

Для изготовления гидрогелей на основе спидроина навеску белка растворяли в 90%-ной муравьиной кислоте, затем аккуратно добавляли метакрилированный желатин и встряхивали до полного растворения. Далее к смеси добавляли фотоинициатор оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%, 5 мас.% по метакрилированному желатину). Концентрация метакрилированного желатина в итоговом растворе составляла не менее 10 мас.% при соотношении мономеров (метакрилированный желатин:спидроин) 2:1.

Фотополимеризация. Для получения макроскопических образцов гидрогелей растворы мономеров (300 мкл) вносили в полипропиленовую форму диаметром 13 мм так, чтобы образовался ровный слой. После этого смесь фотополимеризовали в свете ультрафиолетовой лампы мощностью

36 Вт в течение 10 мин. Далее в формы добавляли 95%-ный этиловый спирт и выдерживали при комнатной температуре в течение одного часа. Затем отмывали растворители избытком дистиллированной воды в течение 2–3 ч при постоянном перемешивании и смене раствора. При необходимости дальнейшего хранения переносили гидрогелевые образцы в 70%-ный этиловый спирт.

Микроскопические гидрогелевые структуры были сформированы посредством фотоотверждения с применением микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония). С помощью программы NIS-elements (Nikon, Япония) создавали шаблоны заданной формы и облучали соответствующие им области смеси, нанесенной на покровное стекло, лазером с длиной волны 405 нм, используя объектив Plan Fluor 40x/1,30 Oil DIC. Отмывали полученные микроstructures дистиллированной водой, после чего обрабатывали их 95%-ным этиловым спиртом.

Культивирование фибробластов 3Т3 на гидрогелях. Фибробласты 3Т3 суспендировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Концентрацию фибробластов доводили до 24 тыс. клеток в одном миллилитре. Гидрогели помещали в чашки Петри диаметром 35 мм и вносили 2 мл суспензии. Через 48 ч клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом. Ядра клеток выявляли красителем SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen, США). Для получения изображений использовали конфокальный микроскоп Axiovert 200M LSM 510 Meta и программное обеспечение 3D for LSM (Zeiss, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия. Гидрогели обезжизивали в возрастающих концентрациях этилового спирта и ацетоне, затем высушивали на приборе Critical point dryer HCP-2 (Hitachi Ltd., Япония) и напыляли слоем платины толщиной 20 нм с использованием прибора IB-3 Ion Coater (Eiko Engineering Co., Ltd, Япония). Полученные образцы изучали на микроскопе CamScan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания).

Результаты и обсуждение

Гидрогели представляют собой трехмерные полимерные сети, способные поглощать и удерживать большие количества воды. Многие исследования посвящены изучению возможности их использования для тканевой инженерии, направленной доставки лекарственных средств и других биомедицинских приложений [7].

Активным направлением применения гидрогелей является создание на их основе раневых покрытий, так как они обладают способностью удерживать экссудат в ране, что способствует ускорению зажив-

ления. Также к достоинствам гидрогелей можно отнести возможность введения в их состав антибиотиков и других фармацевтических препаратов [8]. Ранее было показано, что изготовленные из фиброина [9] и спидроина [10] микроносители при введении в область полнослойной кожной раны способствуют ускорению заживления с восстановлением всех структурных компонентов кожи. Вероятно, раневые покрытия, сформированные из гидрогелей на основе данных структурных белков шелка, также могут способствовать регенерации. В рамках данной работы были созданы прототипы таких изделий, состоящие из метакрилизованного желатина в сочетании со спидроином или фиброином. Были получены образцы гидрогелей в виде дисков диаметром 13 мм (рисунок, А и Б).

В качестве фотоинициатора был выбран оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%), являющийся высокореактивным нерастворимым

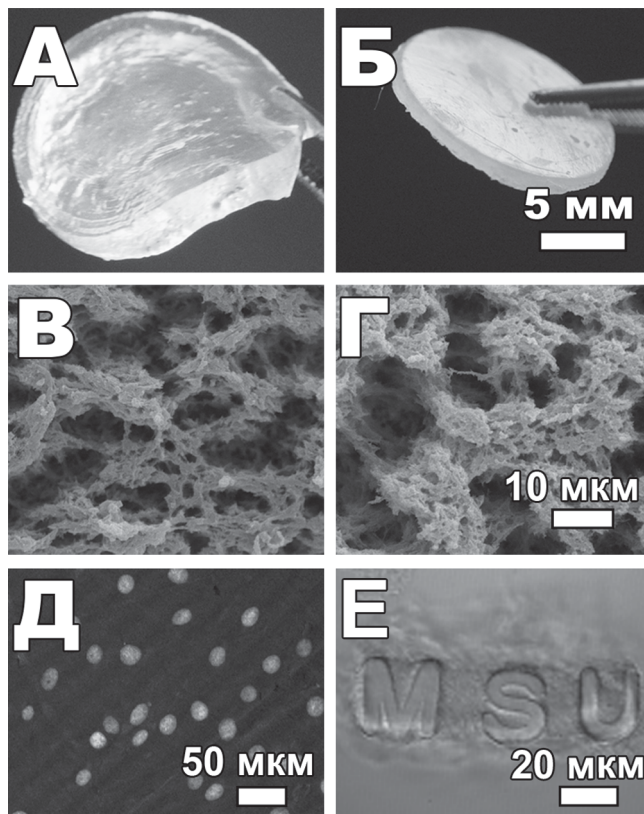


Рисунок. Фотоотверждаемые гидрогели, содержащие спидроин (А, В) или фиброин (Б, Г, Д). А – диски, сформированные из гидрогелей на основе метакрилизованного желатина и спидроина. Б – диски, сформированные на основе метакрилизованного желатина и фиброина. В, Г – структура дисков на основе метакрилизованного желатина в сочетании со спидроином (В) или с фиброином (Г), изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии. Д – ядра фибробластов 3Т3, культивируемых 48 ч на поверхности гидрогеля на основе метакрилизованного желатина в сочетании со спидроином. Е – микроstructure, сформированная из гидрогеля на основе фиброина и метакрилизованного желатина

в воде соединением, применяемым для быстрого фотоотверждения, например, для лазерной стереолитографии. В ранее описанной системе с метакрирированным желатином и фиброином был использован 2-гидрокси-4'-(2-гидроксиэтокси)-2-метилпропиофенон (Irgacure 2959) [4]. Это изменение позволило сократить время требуемого УФ-облучения в 5–10 раз и осуществлять фотополимеризацию в слоях раствора толщиной до 5 мм.

Внутреннее пространство высушенных дисков характеризовалось пористой структурой (рисунок, В и Г). Для оценки биосовместимости фотоотверждаемых гидрогелей в модельных системах *in vitro* были использованы мышинные фибробласты линии 3Т3. На рисунке (Д) представлено репрезентативное изображение ядер клеток через 48 ч после нанесения суспензии фибробластов на поверхность спидроин-содержащего гидрогеля. Плотность клеток указывает на их активную пролиферацию. Аналогичные данные были получены и для фиброин-содержащих гидрогелей. Таким образом, фотоотверждаемые производные фиброина или спидроина после их модификации метакрирированным желатином и фотоотверждающими реагентами сохраняют биосовместимость в модельных системах *in vitro*.

Возможность создания микроскопических структур была оценена с использованием оптической системы конфокального микроскопа. На поверхности покровного стекла были сформированы рельефные элементы из гидрогеля на основе фиброина

шелка, линейные размеры которых в одном из сечений не превышали 5 мкм (рисунок, Е). Микроструктурированные поверхности могут применяться в модельных системах для изучения влияния микроокружения клеток на их функции. В частности, могут быть разработаны алгоритмы для автоматизированного изучения единичных клеток [11]. Кроме того, применение метакрирированного желатина позволяет адаптировать производные структурных белков шелка к аддитивным технологиям и технологиям прототипирования.

Таким образом, были получены фотоотверждаемые гидрогели на основе метакрирированного желатина и рекомбинантного спидроина и фотоотверждаемые гидрогели на основе метакрирированного желатина и фиброина шелка, которые могут быть использованы при формировании скаффолдов для тканевой инженерии и раневых покрытий, в том числе микроструктурированных. Биосовместимые фотоотверждаемые производные спидроина были получены впервые.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в соответствии с соглашением о предоставлении субсидий №14.604.21.0167 от 26 сентября 2017 г. «Создание функционализированного композитного фотоотверждаемого биоразлагаемого материала на основе структурного белка шелка и метакрирированных производных желатина» (уникальный идентификатор RFMEFI60417X0167).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li S., Tuft B.W., Xu L., Polacco M.A., Clarke J.C., Guymon C.A., Hansen M.R. Microtopographical features generated by photopolymerization recruit RhoA/ROCK through TRPV1 to direct cell and neurite growth // *Biomaterials*. 2015. Vol. 53. P. 95–106.
2. Chia H.N., Wu B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials // *J. Biol. Eng.* 2015. Vol. 9. 4.
3. Yue K., Trujillo-de Santiago G., Alvarez M., Tamayol A., Annabi N., Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels // *Biomaterials*. 2015. Vol. 73. P. 254–271.
4. Xiao W., He J., Nichol J.W., Wang L., Hutson C.B., Wang B., Du Y., Fan H., Khademhosseini A. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels // *Acta Biomater.* 2011. Vol. 7. N 6. P. 2384–2393.
5. Moisenovich M.M., Pustovalova O.I., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 15. P. 3887–3898.
6. Sidoruk K.V., Davydova L.I., Kozlov D.G., Gubaidullin D.G., Glazunov A.V., Bogush V.G., Debabov V.G. Fermentation optimization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain producing 1F9 recombinant spidroin // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. Vol. 51. N 7. P. 766–773.
7. Caló E., Khutoryanskiy V.V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products // *Eur. Polym. J.* 2015. Vol. 65. P. 252–267.
8. Kamoun E.A., Kenawy E.R.S., Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings // *J. Adv. Res.* 2017. Vol. 8. N 3. P. 217–233.
9. Arkhipova A.Y., Nosenko M.A., Malyuchenko N.V., Zvyartsev R.V., Moisenovich A.M., Zhdanova A.S., Vasil'eva T.V., Gorshkova E.A., Agapov I.I., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Moisenovich M.M. Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice // *Biochemistry (Mosc)*. 2016. Vol. 81. N 11. C. 1251–1260.
10. Moisenovich M.M., Malyuchenko N.V., Arkhipova A.Y., Kotlyarova M.S., Davydova L.I., Goncharenko A.V., Agapova O.I., Drutskaya M.S., Bogush V.G., Agapov I.I., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P. Novel 3D-microcarriers from recombinant spidroin for regenerative medicine // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015. Vol. 463. N 1. P. 232–235.
11. Burri O., Wolf B., Seitz A., Gönczy P. TRACMIT: An effective pipeline for tracking and analyzing cells on micropatterns through mitosis // *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12. N 7. e0179752.

Поступила в редакцию
14.11.2017

Принята в печать
15.12.2017

METHODS

PHOTOCURABLE HYDROGELS CONTAINING METHACRYLATED GELATIN AND SPIDROIN OR FIBROIN

I.V. Bessonov¹, M.S. Kotliarova^{1,}, M.N. Kopitsyna¹, A.V. Fedulov²,
A.M. Moysenovich¹, A.Yu. Arkhipova³, V.G. Bogush⁴, D.V. Bagrov¹,
A.A. Ramonova³, A.E. Mashkov², K.V. Shaitan¹, M.M. Moisenovich³*

¹Department of Bioengineering and ³Laboratory of Confocal Microscopy, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute,
Shepkina st. 61/2–1, Moscow, 129110, Russia;

⁴State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National
Research Center “Kurchatov Institute”, 1-st Dorozhniy pr. 1, Moscow, 117545, Russia

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Photocurable hydrogels were fabricated from methacrylated gelatin and silk proteins, including recombinant analogue of spidroin from *Nephila clavipes* spider web and fibroin from the cocoons of the silkworm *Bombyx mori*. These polymers have high applicability in tissue engineering due to their biocompatibility and biodegradability. Hydrogels were fabricated using two different methods that allowed us to obtain either large-sized products or microstructures of certain shape. For the production of extensive hydrogels, samples were photopolymerized in the UV light within ten minutes. As a result samples of hydrogels were obtained as disks with a diameter of 13 mm. Scanning electron microscopy confirmed their porous structure. Microstructures were formed on coverslips using confocal microscope Eclipse Ti-E with 405 nm laser. This approach gives us an opportunity to control the topographic features of the obtained substrates and is applicable for creating micropatterns for studying the interaction of cells with a substrate.

Keywords: hydrogels, photopolymerization, spidroin, fibroin, tissue engineering, methacrylic gelatin

Сведения об авторах

Бессонов Иван Викторович — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-348-95-58; e-mail: ivanbessonov@gmail.com

Котлярова Мария Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Копицына Мария Николаевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-348-95-58; e-mail: mariankuznetsova@gmail.com

Федулов Александр Владимирович — науч. сотр., детский хирург отделения детской хирургии Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-631-74-45; e-mail: iksanderf@mail.ru

Моисенович Анастасия Михайловна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: a-moisenovich@mail.ru

Архипова Анастасия Юрьевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@yandex.ru

Богущ Владимир Григорьевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии ГосНИИгенетики. Тел.: 8-495-315-04-56; e-mail: bogush@genetika.ru

Багров Дмитрий Владимирович — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: dbagrov@gmail.com

Рамонова Алла Аликовна — мл. науч. сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-56; e-mail: a.ramonova@yandex.ru

Машков Александр Евгеньевич — докт. мед. наук, руководитель отделения детской хирургии Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-631-05-82; e-mail: malexe@yandex.ru

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru

Моисенович Михаил Михайлович — канд. биол. наук, зав. лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mmoisenovich@mail.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.262.24

МОРФОЛОГИЯ ПОРОВЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *EUASTRUM* RALFS (DESMIDIALES)О.В. Анисимова^{1,*}, О.В. Штаер²

¹Звенигородская биологическая станция и ²кафедра микологии и альгологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: anissimova@mail.bio.msu.ru

Было проведено исследование строения клеточной стенки у 10 видов *Euastrum* — *E. ansatum* (Ehrenb.) Ralfs, *E. bidentatum* Näg., *E. binale* (Turp.) Ehrenb. ex Ralfs, *E. dubium* Näg., *E. elegans* (Bréb.) Kütz. ex Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieger, *E. oblongum* (Grev.) Ralfs ex Ralfs, *E. pectinatum* Bréb. ex Bréb. in Ralfs, *E. validum* West et G.S. West, *E. verrucosum* (Ehrenb.) ex Ralfs. Изучение ультраструктуры клеточной стенки позволило впервые установить, что поровый канал у 6 из 10 видов всегда имеет в той или иной степени извитую форму. Три представителя (*E. germanicum*, *E. pectinatum* и *E. verrucosum*) имели как извитые, так и прямые поровые каналы, *E. ansatum* — только прямые. Также был отмечен новый тип пор (P_7), характерных только для представителей рода *Euastrum*. Отработан простой и эффективный метод подготовки клеток десмидиевых водорослей к исследованию на просвечивающем электронном микроскопе.

Ключевые слова: *Euastrum*, клеточная стенка, поровый канал, десмидиевые, таксономия, просвечивающий электронный микроскоп

Плакодермные десмидиевые водоросли — это группа одноклеточных представителей класса Conjugatophyceae, которые характеризуются симметричной формой клеток и специфической орнаментацией клеточной стенки. Особенностью этих водорослей является наличие пор, пронизывающих клеточную стенку. Образование и строение клеточных покровов изучали многие исследователи, начиная еще с конца XIX века, однако появление в XX веке сканирующего (СЭМ) и просвечивающего (трансмиссионного, ТЭМ) электронных микроскопов позволило детально изучить ультраструктуру покровов клеток. Электронно-микроскопические исследования клеточной стенки десмидиевых водорослей показали, что она образована тремя слоями [1, 2]. Наружный слой оболочки, за счет присутствия в нем пектиновых веществ, формирует слизистый чехол. Два внутренних слоя образованы фибриллами целлюлозы [3]. У представителей семейства Desmidiaceae в процессе деления первичная целлюлозная клеточная стенка сбрасывается сразу после формирования вторичной, пронизанной поровыми каналами [4]. К настоящему времени накоплен большой массив данных относительно строения и морфогенеза клеточной стенки и порового аппарата в семействе Desmidiaceae, однако исследования проводили только на нескольких представителях родов: одноклеточных — *Micrasterias* [1, 5], *Cosmarium* [6, 7], *Pleurotaenium* [3], *Oocardium* [8], *Stauroastrum* [9], и нитчатых колониальных — *Bambusina*, *Desmidium*, *Hyalotheca*, *Spondylosium*, *Sphaerosoma* [10].

Детальное изучение порового аппарата десмидиевых водорослей с помощью СЭМ позволило описать 6 типов пор: P_1 — двухуровневая поровая система “центральная слизевая пора”; P_2 — поровое отверстие открывается в круглом поровом поле; P_3 — схожие с P_2 , но поровое поле более глубокое и узкое; P_4 — поровое отверстие открывается на уровне клеточной стенки, без специальных углублений; P_5 — поры, расположенные рядом с бородавками, открываются либо в их основании, либо на вершине; P_6 — отверстие поры окружено валиком из клеточной стенки [11]. На примере 23 видов из 8 родов авторы показали, что наибольшее разнообразие поровых аппаратов встречается в родах *Euastrum* (P_1 – P_5) и *Cosmarium* (P_2 – P_4); в родах *Stauroastrum*, *Micrasterias*, *Tetmemorus*, *Pleurotaenium* и *Xanthidium* встречаются преимущественно поры P_4 , а поры P_6 обнаружены только в роде *Desmidium*.

Ни в одной из публикаций не описано, как поровый канал пронизывает вторичную клеточную стенку десмидиевых водорослей. Из обильного иллюстративного материала, имеющегося в публикациях, можно заключить, что у всех таксонов канал является прямым цилиндрическим и только у *Stauroastrum luetkemuellerei* Donat et Ruttner [9] можно наблюдать извитой канал. Таким образом, насколько форма порового канала может варьировать у разных таксонов десмидиевых водорослей, остается неясным.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили культуры 10 видов *Euastrum*, выделенные нами из болот Московской области — *E. bidentatum* Näg., *E. binale* (Turp.) Ehrenb. ex Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieger, *E. validum* West et G.S. West, *E. verrucosum* (Ehrenb.) ex Ralfs, а также водоемов Карелии — *E. ansatum* (Ehrenb.) Ralfs, *E. dubium* Näg., *E. elegans* (Bréb.) Kütz. ex Ralfs, *E. oblongum* (Grev.) Ralfs ex Ralfs, *E. pectinatum* Bréb. ex Bréb. in Ralfs. Водоросли выращивали на питательной среде WH [12] с соблюдением следующих условий: фотопериод (свет/темнота, ч) 14/10, искусственное освещение светодиодными лампами (холодный белый) 5400 Лк, температура +12°C. Через 2 мес. культивирования водоросли были зафиксированы и подготовлены к исследованию с помощью ТЭМ (JEOL JEM-100B и JEOL JEM-1011, Япония). Фиксацию проводили 2,5%-ным формальдегидом в течение 1 ч при комнатной температуре, в качестве буфера использовали питательную среду WH (pH 7,0). Постфиксацию проводили 3%-ным раствором перманганата калия (1 ч). Обезвоживали материал в возрастающей концентрации этилового спирта (30%, 50%, 70%, 90%, 96%) по 10 мин. с последующим переносом в 100%-ный ацетон. В смеси смолы эпон и ацетона (1:1) материал выдерживали 24 ч, после чего переносили в смолу с катализатором и выдерживали 24 ч при температуре 37°C и 48 ч при температуре 60 °C. Серии срезов толщиной 80–120 нм были получены на ультрамикротоме Ultratom-3 (LKB, Швеция), помещены на медные бленды и контрастированы цитратом свинца в течение 8 мин. (по Рейнольдсу). Такой метод подготовки материала позволяет хорошо сохранить клеточную стенку и в

минимальной степени нарушить содержание са-мой клетки.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было показано, что форма порового канала у 6 из 10 изученных видов всегда имеет в той или иной степени извитую форму. У двух таксонов встречаются прямые и извитые, а у одного — только прямые каналы (таблица). Наиболее часто встречающийся поровый канал P_4 у разных видов всегда извит и имеет равномерную толщину на всем протяжении (рисунок, А, Б). Поровый канал P_5 всегда связан с бородавками (рисунок, В, Г), располагается в их основании или на вершине и также извит. У всех видов, несущих бородавки, такие поры присутствуют.

Предыдущее наше исследование [13] показало, что для рода *Euastrum* характерно наличие специфических ямок (скробикул, S_1 – S_4) на поверхности клеточной стенки. При этом расположение и форма скробикул и пор всегда взаимосвязаны. Сопоставляя наши данные с классификацией пор, предложенной ранее [11], мы пришли к выводу, что тип пор P_2 необходимо переопределить. Так, поры типа 7 (P_7) представляют собой сочетание одного из вариантов поры P_2 , описанной ранее, и скробикулы S_2 : поровый канал пронизывает утолщение клеточной стенки, которое окружено розеткой из нескольких (2–4) углублений-сегментов (рисунок, Д, Е). Такое строение поры встречается только у представителей рода *Euastrum*, поэтому его следует отличать от P_2 . Форма порового канала рассмотрена нами на примере двух видов — *E. ansatum* и *E. oblongum*, у которых скробикулы S_2 покрывают всю поверхность за исключением вершин лопастей и вздутий.

Таблица

Типы скробикул и пор у некоторых видов *Euastrum*

Таксон	Тип скробикул	Тип пор	Форма канала	Длина клетки, мкм	Толщина клеточной стенки, мкм	Диаметр пор, мкм
<i>Euastrum ansatum</i>	S_1, S_2, S_4	P_1, P_3, P_7	Прямой	65–102	0,49–0,65	0,07–0,09
<i>E. bidentatum</i>	S_1, S_3	P_4, P_5	Извитой	40–65	0,55–0,85	0,07–0,09
<i>E. binale</i>	S_3	P_4, P_5	Извитой	14–36	0,30–0,40	0,05–0,09
<i>E. dubium</i>	S_3	P_4, P_5	Извитой	22–38	0,30–0,40	0,05–0,09
<i>E. elegans</i>	S_3	P_4, P_5	Извитой	24–38	0,37–0,77	0,05–0,09
<i>E. germanicum</i>	—	P_4, P_5	Извитой или прямой	52–66	0,58–0,88	0,09–0,14
<i>E. oblongum</i>	S_1, S_2, S_4	P_1, P_3, P_7	Извитой	119–204	0,90–1,20	0,09–0,20
<i>E. pectinatum</i>	—	P_4, P_5	Извитой или прямой	57–80	0,60–1,10	0,09–0,10
<i>E. validum</i>	S_3	P_4, P_5	Извитой	24–30	0,20–0,60	0,02–0,07
<i>E. verrucosum</i>	—	P_4, P_5	Извитой или прямой	75–118	0,80–0,90	0,09–0,13

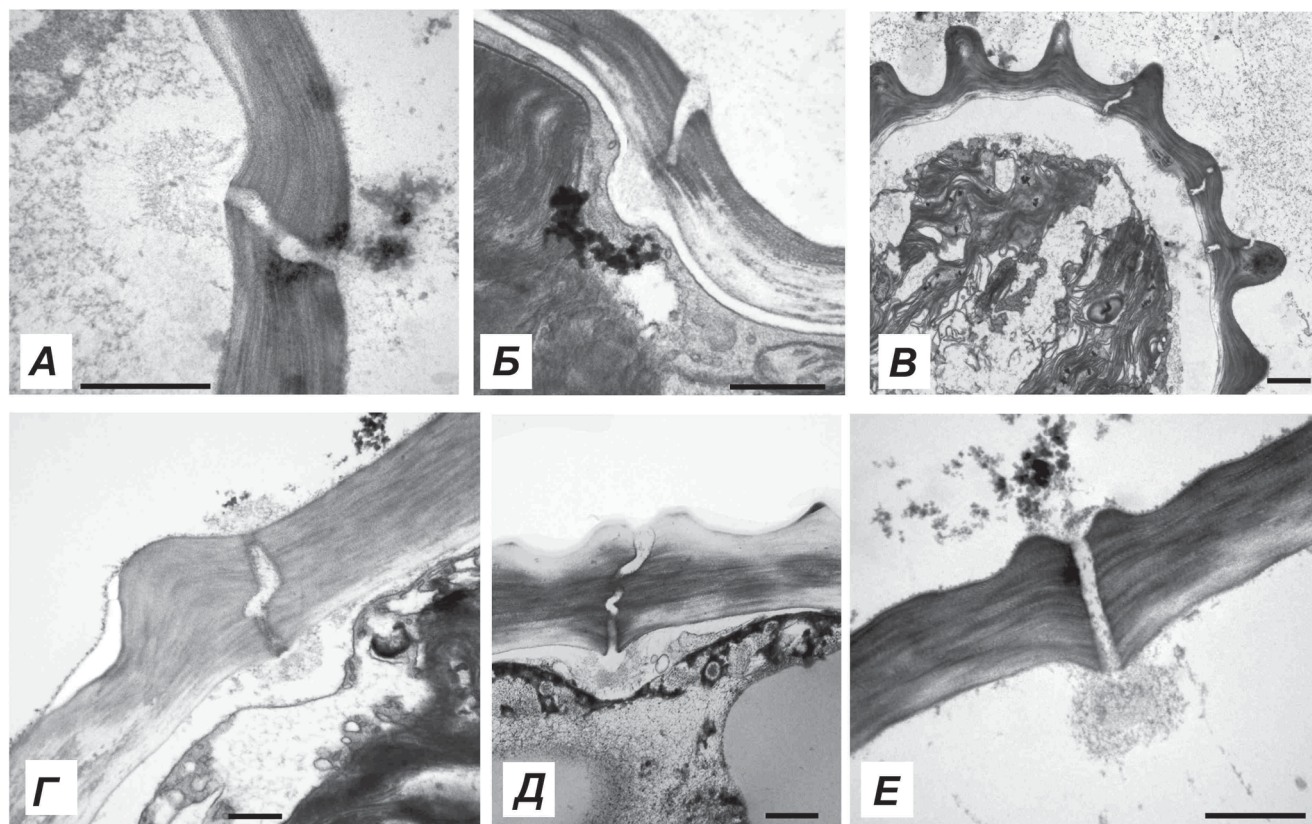


Рисунок. Поровый аппарат P_4 : *A* — *Euastrum elegans*, *Б* — *E. dubium*; поровый аппарат P_5 : *Б* — *E. germanicum*, *Г* — *E. verrucosum*; поровый аппарат P_7 : *Д* — *E. oblongum*, *Е* — *E. ansatum*. Масштабная линейка: *А, Б, Г–Е* — 0,5 мкм, *Б* — 1 мкм

У *E. ansatum* поровый канал P_7 имеет прямую форму (рисунок, *Е*), в то время как у *E. oblongum* он извитой и не равномерен по толщине: наружу открывается отверстием большего диаметра (рисунок, *Д*).

Существует группа видов *Euastrum*, у которых скребиколы отсутствуют [13]. Исследованные нами *E. germanicum* и *E. verrucosum* имеют бородавки и поры P_4 ; в участках, где бородавок нет, располагаются поры P_5 . Оболочка у *E. pectinatum* ячеистая, и поровые каналы P_4 пронизывают ее равномерно по всей поверхности без взаимосвязи с ячейками. На вершинах всех вздутых имеется одна пора, по своему строению идентичная P_5 . Кроме того, у этих трех видов на вершине полярной лопасти располагается апикальное поровое поле, характерное для рода *Cosmarium*, что также указывает на необходимость пересмотра их таксономического положения.

Сопоставление размеров клеток с толщиной клеточной стенки и диаметром порового канала (таблица) подтверждает гипотезу [11, 14], согласно которой у более крупных клеток толщина оболочки и диаметр пор больше, чем у мелких. Так, у мелкоклеточных видов (длина клеток не более 40 мкм) *E. binale*, *E. dubium*, *E. elegans*, *E. validum* толщина клеточной стенки варьирует от 0,2 до 0,7 мкм, а диаметр пор — от 0,02 до 0,09 мкм. Виды с клетками крупных размеров (более 40 мкм длиной) — *E. ansatum*, *E. bidentatum*, *E. pectinatum*, *E. oblongum*, *E. verrucosum*, имеют в среднем более толстую клеточную стенку и широкий поровый канал (от 0,09 мкм).

Учитывая поставленные задачи — исследовать поровый аппарат клеточной стенки водорослей, мы опробовали несколько вариантов подготовки образцов к ТЭМ. Классический и универсальный метод двойной фиксации представляет собой последовательную фиксацию в 2,5%-ом глутаровом альдегиде и 1–2%-ном тетраоксиде осмия (на фосфатном буфере pH 7,2–7,4), а также отмывку в дистиллированной воде с последующим контрастированием 2%-ным уранилацетатом. Другой, несколько устаревший, метод с использованием 2,5%-ного формалина и 3%-ного водного раствора перманганата калия, приводит к некоторой деформации эндомембранных структур и органелл клетки. Для нашей работы сохранность внутренней ультраструктуры клетки желательна, но при условии сохранения структуры клеточной стенки, близкой к прижизненной, недостатками химической фиксации можно пренебречь. При сравнении результатов нескольких вариантов пробоподготовки оказалось, что устаревший метод, где вместо буфера мы использовали питательную среду WH, хорошо сохраняет структуру клетки, включая мембранные элементы. Это наиболее подходящие реагенты для работы с водорослевыми клетками (процесс предполагает поштучный отбор исследователем клеток десмидиевых водорослей на каждом этапе подготовки, вплоть до заливки в смолу эпон). Стоит отметить, что использование менее токсичных и летучих реактивов значительно упрощает работу и при этом гарантирует качественный результат (рисунок).

Исследования проведены в рамках госзадания МГУ, ч. 2 (р. 01 10), на оборудовании Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства

образования и науки РФ. Работы, связанные с формированием коллекции культур, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drawert H., Metzner-Kustei I. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. I. Mitteilung. Zellwand- und galleitstrukturen bei einigen arten // Planta. 1961. Vol. 56. N 1. P. 213–228.
2. Mix M. Die Feinstruktur der Zellwände bei Mesotaeiaceae und Gonatozygaceae mit einer vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Wandtypen der Conjugatophyceae und über deren systematischen Wert // Arch. Mikrobiol. 1972. Vol. 81. N 3. P. 197–220.
3. Drawert H., Mix M. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. II. Mitteilung Hüllgallerte und Schleimbildung bei *Micrasterias*, *Pleurotaenium* und *Hyalotheca* // Planta. 1961. Vol. 56. N 3. P. 237–261.
4. Brook A.J. The biology of Desmids. Botanical Monographs, vol. 16. Oxford: Blackwell, 1981. 276 pp.
5. Oertel A., Aichinger N., Hochreiter R., Thalhamer J., Lutz-Meindl U. Analysis of mucilage secretion and excretion in *Micrasterias* (Chlorophyta) by means of immunoelectron microscopy and digital time lapse video microscopy // J. Phycol. 2004. Vol. 40. N 4. P. 711–720.
6. Lott J.N.A., Harris G.P., Turner Ch.D. The cell wall of *Cosmarium botrytis* // J. Phycol. 1972. Vol. 8. N 3. P. 232–236.
7. Cheli F., De Vecchi L. An ultrastructural and cytochemical study on Conjugatophyceae cell wall // Caryologia. 1989. Vol. 42. N 2. P. 127–137.
8. Rott E., Holzinger A., Gesierich D., Kofler W., Sanders D. Cell morphology, ultrastructure, and calcification pattern of *Oocardium stratum*, a peculiar lotic desmid // Protoplasma. 2010. Vol. 243. N 1–4. P. 39–50.
9. Andersen S., Heldal M., Knutsen G. Cell wall structure and iron distribution in the green alga *Staurastrum luetkemuellieri* (Desmidiaceae) // J. Phycol. 1987. Vol. 23. N 4. P. 669–672.
10. Gerrath J.F. Studies on the ultrastructure of desmids and its relation to their taxonomy. Vancouver: Univ. British Columbia, 1968. 165 pp.
11. Neuhaus G., Kiermayer O. Formation and distribution of cell wall pores in desmids // Cytomorphogenesis of plants. Cell biology monographs, vol. 8 / Ed. O. Kiermayer. Vienna: Springer, 1981. P. 215–231.
12. Schlösser U.G. Origin and function of the culture collection // Ber. Deutsch. Bot. Ges. 1982. Vol. 95. N 2. P. 181–276.
13. Anissimova O.V. Architecture of cell wall of *Euastrum* Ralfs: new genus criteria // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 3. P. 155–159.
14. Mix M. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. XII. Zur Feinstruktur der Zellwände und Mikrofibrillen einiger Desmidiaceen vom *Cosmarium*-Typ // Arch. Mikrobiol. 1966 Vol. 55. N 2. P. 116–133.

Поступила в редакцию
06.07.2017

Принята в печать
11.12.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

MORPHOLOGY OF CELL WALL PORE CHANNELS IN GENUS *EUASTRUM* RALFS (DESMIDIALES)

O.V. Anissimova^{1,*}, O.V. Staer²

¹Zvenigorod Biological Station and ²Department of Mycology and Algology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: anissimova@mail.bio.msu.ru

The study of the cell wall structure was performed for 10 species of *Euastrum* – *E. ansatum* (Ehrenb.) Ralfs, *E. bidentatum* Näg., *E. binale* (Turp.) Ehrenb. ex Ralfs, *E. dubium* Näg., *E. elegans* (Bréb.) Kütz. ex Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieger, *E. oblongum* (Grev.) Ralfs ex Ralfs, *E. pectinatum* Bréb. ex Bréb. in Ralfs, *E. validum* West et G.S.West, *E. verrucosum* (Ehrenb.) ex Ralfs. The investigation of the cell wall ultrastructure has established, for the first time, that the pore canal in 6 of 10 species always has to some degree coiled form. Three species (*E. germanicum*, *E. pectinatum* и *E. verrucosum*) have both coiled and straight canals, and *E. ansatum* – only straight ones. Also new type of pores (P₇), typical only for representatives of the genus *Euastrum*, was noted. Besides, simple and effective method of preparing desmidium algal cells for investigation with transmission electron microscope has been developed.

Keywords: *Euastrum*, cell wall, pore canal, Desmidiaceae, taxonomy, transmission electron microscopy

Сведения об авторах

Анисимова Ольга Викторовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Звенигородской биологической станции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: anissimova@mail.bio.msu.ru

Штаер Оксана Васильевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: sht-oks@yandex.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 574.5

ОБНАРУЖЕНИЕ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ *THOREA HISPIDA* (THORE) DESV. (RHODOPHYTA) В РЕКЕ МОСКВЕ

А.А. Георгиев*, Г.А. Белякова, Д.А. Чудаев, М.Л. Георгиева, М.А. Гололобова

*Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: semga2001@yandex.ru*

В Московской области вид *Thorea hispida* (Thore) Desv. впервые был обнаружен в начале XX века. Впоследствии он был найден в реке Москве на территории города Москвы только в 2004 г., где с этого времени выявляется ежегодно. *T. hispida* включен в Красную книгу РФ и Красные книги некоторых европейских стран. В настоящей работе представлены новые данные о распространении *T. hispida* в реке Москве, приведены результаты морфологического изучения данного вида и рассмотрены некоторые проблемы, касающиеся его охранного статуса.

Ключевые слова: *Thorea hispida*, красные водоросли, Rhodophyta, морфология, природоохранный статус вида, река Москва, Красная книга

Thorea hispida (Thore) Desvaux (Синоним: *Thorea ramosissima* Bory) — один из наиболее распространенных и хорошо изученных видов пресноводных красных водорослей семейства Thoreaceae (отдел Rhodophyta, класс Florideophyceae, порядок Thoreales). Он встречается в разных странах Европы, Азии, Америки [1]. *T. hispida* включен в Красные книги некоторых европейских стран, например, Болгарии [2], Словакии [3], Германии [4], Литвы [5], Польши [6], Сербии [7], Украины [8]; в то же время, этот вид не входит в Красный список Международного союза охраны природы [9]. Несмотря на широкое распространение, популяции *T. hispida* обычно малочисленны [8].

На территории Европейской России, в частности, в Московской области, вид впервые был обнаружен в начале XX века [10]. На территории РФ он отмечен также в Приморском крае, однако эти данные требуют подтверждения. В настоящее время *T. hispida* включен в Красную книгу РФ [11].

T. hispida является реофильным видом, встречается в водоемах с быстрым течением, где чаще всего обитает на небольших глубинах (около 0,5 м). Иногда выявляется в медленно текущих водах [12]. *T. hispida* колонизирует различные погруженные в воду субстраты (природные и искусственные): деревянные сваи мостов, стволы и ветви гниющих деревьев, каменные и бетонные блоки и даже нейлоновые тросы у шлюзов и мостов [13, 14]. Часто встречается среди молодых талломов зеленых водорослей (например, *Enteromorpha* или *Cladophora*) [8].

В настоящей работе приводятся новые данные о распространении *T. hispida* в реке Москве и результаты изучения морфологии данного вида, а также обсуждаются некоторые проблемы, касающиеся его охранного статуса.

Материалы и методы

Талломы гаметофитов *T. hispida* были собраны в безледные периоды на разных участках реки Москвы в течение 2004–2017 гг. Часть материала была гербаризована, а другая часть — зафиксирована 4%-ным раствором формальдегида. Материал хранится в фондах альгологической коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Морфологические исследования талломов проводили с использованием микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC495, и стереомикроскопа Leica M80 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica IC80HD.

Результаты и обсуждение

Морфология талломов *T. hispida*. Талломы гаметофитов *T. hispida* являются макроскопическими, мягкими и слизистыми, длиной 10–20 см (редко до 35 см), многократно и обильно разветвленными, диаметром 0,5–3 мм (рис. 1). Талломы окрашены в темный, буровато-зеленый, почти черный цвет, в гербарии становятся темно-фиолетового цвета.

Таллом гаметофита многоосевой, состоящий из медуллярных нитей и коровых ассимиляционных нитей. Медуллярная область (центральная ось) шириной 100–300 мкм состоит из разветвленных и переплетенных между собой бесцветных нитей. Ассимиляционные нити являются разветвленными или неразветвленными, окрашенными, представлены двумя типами. Длинные ассимиляционные нити — длиной 400–1000 мкм, в основном простые или иногда раздвоенные у основания, реже в средней части, состоят из 15–28 клеток

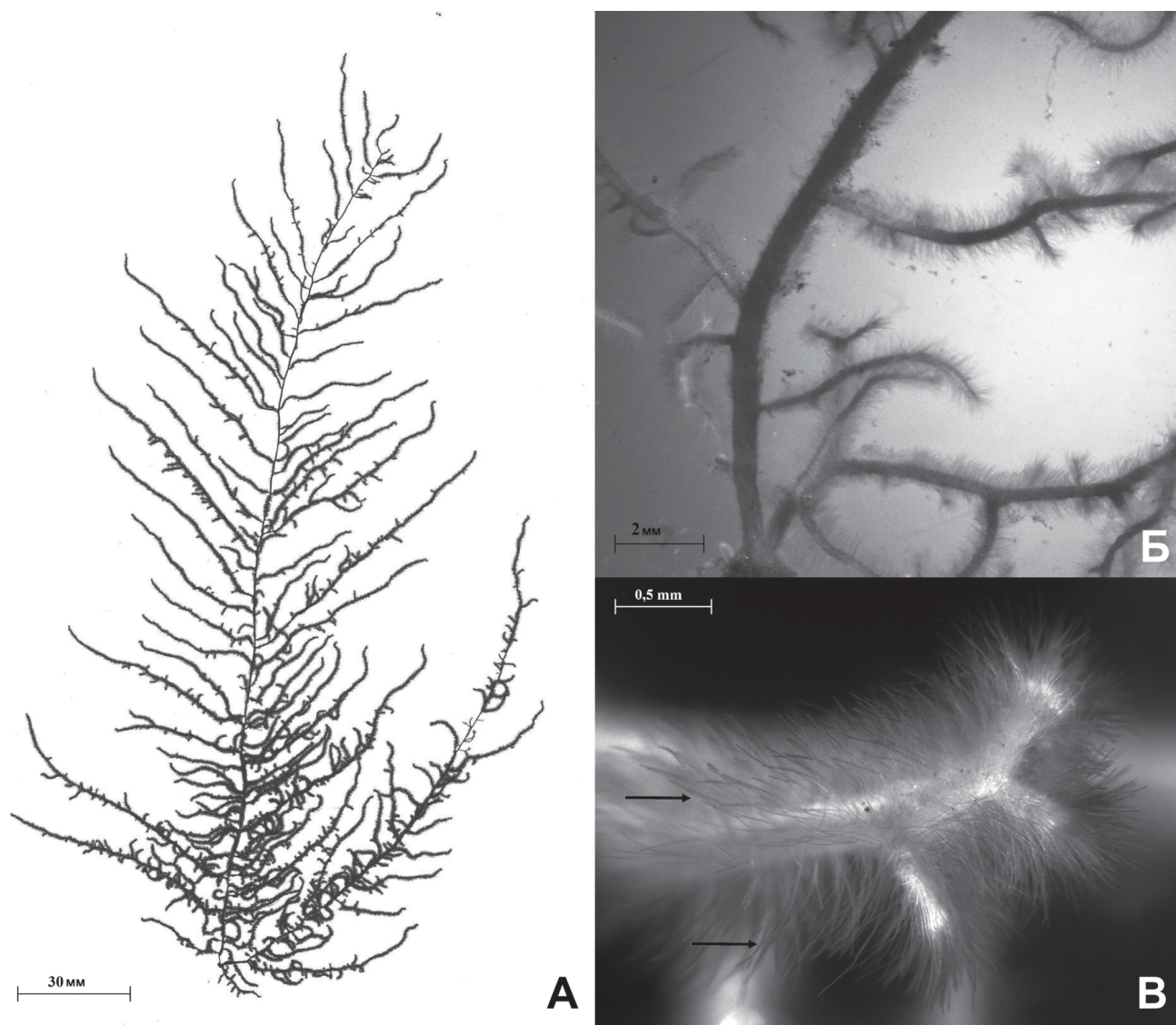


Рис. 1. Гаметофит *T. hispida*. А — общий вид таллома; Б, В — детали таллома с ветвлениями (стрелками показаны ассимиляционные нити)

длиной 20–45 мкм, шириной 4–8 мкм. Короткие ассимиляционные нити разветвлены, чаще ближе к верхушке, состоят из 3–7 клеток; клетки цилиндрической или овальной формы, длиной 8–12 мкм, шириной 4–11 мкм. Короткие и длинные нити образуют относительно плотный коровый слой шириной около 60–80 мкм; длинные нити выступают за пределы этого слоя, и из-за этого талломы выглядят опушенными (рис. 1 и рис. 2, А). Моноспорангии располагаются на верхушках коротких ассимиляционных нитей, одиночные или в группах по 2–3, яйцевидной или грушевидной формы, 15–22 мкм длиной, 7–8 мкм шириной (рис. 2, Б). Гаметангии не отмечены. Спорофиты (*Chantransia*-стадия) не были обнаружены.

T. hispida характеризуется широкими вариациями морфологических признаков. Наши образцы соответствуют протологу и более поздним подробным описаниям этого вида [1, 12, 15, 16].

Локальное распространение *T. hispida*. Первые зафиксированные находки *T. hispida* на территории

Московской области относятся к началу XX века, где этот вид встречался спорадически. *T. hispida* был зарегистрирован на территории Одинцовского, Орехово-Зуевского, Павлово-Посадского и Дмитровского районов. После этого вид длительное время (в течение нескольких десятилетий) не выявлялся в Московской области [10].

Нами *T. hispida* был выявлен в сентябре 2004 г. в реке Москве на территории города Москвы (Воробьевы горы, рядом с Андреевским мостом, 55°42'49.3"N, 37°34'41.2"E). Талломы были обнаружены на обоих берегах реки на находящихся в воде бетонных конструкциях моста и парапетах. Они также присутствовали на камнях и различных железных предметах, встречающихся на дне реки. Большая часть талломов развивалась на глубине 10–40 см. Талломы, растущие ближе к поверхности воды, периодически обнажались в результате действия волн.

Максимальная плотность произрастания талломов *T. hispida* (до 30 экземпляров на м²) была

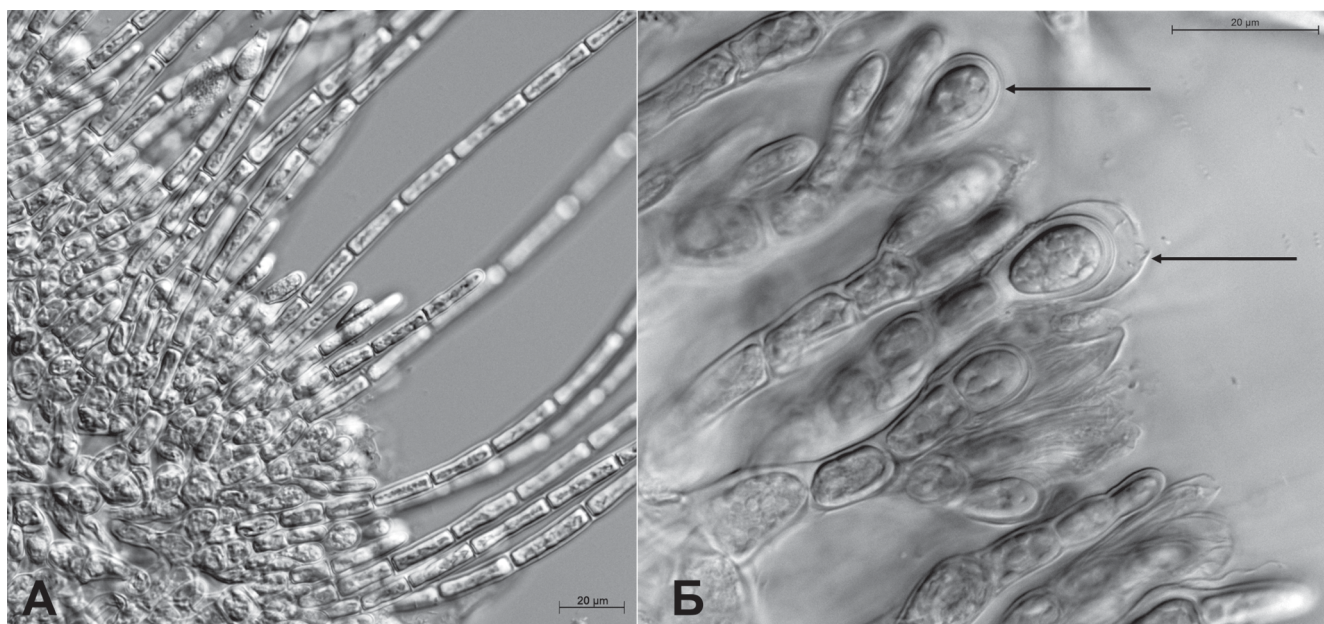


Рис. 2. Детали строения гаметофита *T. hispida*. А — короткие и длинные ассимиляционные нити; Б — короткие ассимиляционные нити с моноспорангиями (показаны стрелками)

отмечена вблизи Андреевского моста, на каменистых поверхностях, на глубине 15–30 см. Интересно, что популяция была локальной; выше и ниже по течению от этого места, по обоим берегам, талломы встречались реже, и спустя 200–300 м водоросль обнаружить не удалось. Популяция *T. hispida* отмечалась ежегодно в районе Андреевского моста и в последующие годы, но талломы были меньшими по размеру и их количество было ниже по сравнению с 2004 г. Летом 2011 г. этот вид был обнаружен в реке Москве на территории Московской области (намного выше по течению, примерно в 50 км от города Москвы, 55°42′05.8″N, 36°43′17.4″E) в районе Звенигородской биологической станции МГУ.

Таким образом, в реке Москве выявлена неустойчивая встречаемость *T. hispida*, так как в течение нескольких десятилетий этот вид в данном водотоке не был отмечен. Подобные ситуации упоминаются и в других исследованиях. Например, на Британских островах популяция *T. hispida* была зарегистрирована в 1989 г., спустя 140 лет после предыдущего наблюдения [14]. В реках Сербии *T. hispida* стал регулярно отмечаться с 1996 г., после 87 лет с последней подтвержденной находки [7]. Для *T. okadae* Yamada (другой вид рода *Thorea*) в Японии указывается, что водоросль была обнаружена после почти десятилетнего ее полного отсутствия [17].

С одной стороны, периодичность встречаемости популяции *T. hispida* может быть объяснена фрагментарностью ареала, где обитает вид. С другой стороны, это может быть связано с некоторыми особенностями жизненного цикла *T. hispida*, а именно, способностью вида сохраняться на стадии трудно идентифицируемого спорофита в течение длительного времени [13]. Спорофит является микроскопи-

ческим, развивается в виде маленьких (несколько миллиметров) подушковидных дерновинок, состоящих из разветвленных однорядных нитей; стадия спорофита морфологически соответствует роду *Chantransia*, и обычно говорят о *Chantransia*-стадии. Известно, что гаметофит *T. hispida* начинает развиваться непосредственно на спорофите из апикальной клетки после редукционного деления [18]. Возможно, для успешного чередования поколений необходимы определенные условия окружающей среды. Например, в культуре было обнаружено, что сочетание повышения температуры (до 20°C) и низкой интенсивности освещения стимулирует развитие макроскопических гаметофитов из *Chantransia*-стадии водоросли [18–20].

Охранный статус *T. hispida*. В целом разнообразие пресноводных красных водорослей в городе Москве и Московской области мало изучено. *T. hispida* является одним из пяти видов пресноводных водорослей, включенных в Красную книгу РФ [11]. Вид имеет статус “2а”, т.е. таксон, сокращающийся в численности в результате изменений условий существования и разрушения местообитаний. Как упоминалось выше, *T. hispida* был обнаружен в начале XX века в нескольких районах Московской области, но после этого длительное время не встречался. В 2004 г. *T. hispida* был выявлен в реке Москве (через 74 г. со времени последней находки) в пределах города Москвы. В 2011 г. талломы *T. hispida* были отмечены в реке Москве в Одинцовском районе Московской области (на Звенигородской биологической станции МГУ).

Следует отметить, что часто причиной исчезновения и редких находок *T. hispida* указывается антропогенное загрязнение воды. Некоторые авторы считают, что *T. hispida* предпочитает развиваться в олиготрофных водах и может считаться

индикатором чистоты водоема [7, 11, 14]. В то же время другие авторы сообщают о находках *T. hispida* в богатых питательными веществами (эвтрофных) водоемах [16, 21]. Детальная физическая, химическая и гидроморфологическая характеристика мест обитания *T. hispida* в Италии была представлена в работе Больпагни и соавторов [13]. Авторы выявили, что *T. hispida* предпочитает развиваться в условиях со сравнительно высокими уровнями азота (до 9,4 мг/л) и фосфора (до 173 мг/л), электропроводности (до 660 мкСм/см), а также высокой мутности воды. Для развития вида предпочтительна высокая скорость течения воды (0,1–1,0 м/с), при этом показатели температуры (5,1°C – 26,2°C) и pH среды (7,1–8,6) могут сильно варьировать [13]. В результате авторы сделали вывод, что, во-первых, вид некорректно считать чувствительным к загрязнению воды, так как он предпочитает развиваться в водотоках с высокой доступностью питательных

веществ, а во-вторых, *T. hispida* не является видом, которому грозит исчезновение.

Наши данные согласуются с мнением коллег в том, что “редкость” *T. hispida* может быть объяснена, прежде всего, особенностями жизненного цикла вида и ограниченной доступностью мест колонизации. При отсутствии резких изменений условий обитания можно ожидать, что *T. hispida* останется постоянным обитателем реки Москвы. Однако для выяснения распространения и встречаемости этого вида в водотоках Московской области и в целом на территории России необходимо проведение дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках Государственного задания, части 2 п. 01 10 (тема № AAAA-A16-116021660085-8). Работа, связанная с проведением морфологических исследований (Георгиев А.А., Чудаев Д.А.), выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. AlgaeBase [Электронный ресурс]. 2017. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения: 29.10.2017).
2. Temniskova D., Stoyneva M.P., Kirjakov I.K. Red List of the Bulgarian algae. I. Macroalgae // Phytol. Balcan. 2008. Vol. 14. N 2. P. 193–206.
3. Hindak F., Hindakova A. Red list of cyanophytes and algae of Slovakia // Red list of plants and animals of Slovakia / Eds. D. Balaz, K. Marhold, and P. Urban. Ochrana Prirody, 2001. P. 14–22.
4. Rote Liste gefährdeter Pflanzen Deutschlands // Schriftenreihe für Vegetationskunde / Eds. G. Ludwig and M. Schnittler. Landwirtschaftsverlag, 1996. P. 1–277.
5. Vitonytė I. First record of red algae *Thorea hispida* in Lithuanian freshwaters // Bot. Lith. 2011. Vol. 17. N 4. P. 165–175.
6. Sieminska J. Red list of algae in Poland // Red List of plants and fungi in Poland / Eds. Z. Mirek, K. Zarzycki, W. Wojewoda, and Z. Szeląg. Kraków: Polish Academy of Science, 2006. P. 37–52.
7. Simić S., Pantović N. Observation on the rare algae *Thorea hispida* (Thore) Desvaux (Rhodophyta) from Serbia // Cryptogamie: Algol. 2010. Vol. 31. N 3. P. 343–353.
8. Догадина Т.В., Громакова А.Б., Горбулин О.С. Новая находка представителя *Rhodophyta* из р. Северский Донец (Украина) // Альгология. 2009. Т. 19. № 3 С. 313–317.
9. IUCN Red List of Threatened Species [Электронный ресурс]. 2017. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 29.10.2017).
10. Усачёва И.С. Водоросли водоемов Московской области. Основы изучения видового разнообразия. М.: ИВП РАН, 2002. 140 с.
11. Белякова Г.А. Торея реснитчатая [Электронный ресурс] // Красная книга Российской Федерации 2017. URL: <https://cicon.ru/toreya-resnitchataya.html> (дата обращения: 29.10.2017).
12. Sheath R.G., Vis M.L., Cole K.M. Distribution and systematics of the freshwater red algal family *Thoreaceae* in North America // Eur. J. Phycol. 1993. Vol. 28. N 4. P. 231–241.
13. Bolpagni R., Amadio C., Johnston E.T., Racchetti E. New physical and chemical perspectives on the ecology of *Thorea hispida* (Thoreaceae) // J. Limnol. 2015. Vol. 74. N 2. P. 294–301.
14. John D.M., Johnson L.R., Moore J.A. Observations on *Thorea ramosissima* Bory (Batrachospermales, Thoreaceae), a freshwater red alga rarely recorded in the British Isles // Brit. Phycol. J. 1989. Vol. 24. N 1. P. 99–102.
15. Simić S.B., Đorđević N.B., Vasiljević B.M. New Record of Red Alga *Thorea hispida* (Thore) Desvaux (Rhodophyta) in the River Sava (Sremska Mitrovica, Serbia) // Water Resour. Manag. 2014. Vol. 4. N 1. P. 47–52.
16. Carmona J.J., Necchi O., Jr. Systematics and distribution of *Thorea* (Thoreaceae, Rhodophyta) from central Mexico and south-eastern Brazil // Phycol. Res. 2001. Vol. 49. N 3. P. 231–239.
17. Sato H., Yokoyama T., Madono K., Tsuji M., Mizuno M., Uodome T., Senoo Y., Sugino N., Nagano M., Mitsuhashi H., Asami K., Michioku K., Harada H. Occurrence patterns of the gametophyte of *Thorea okadae* (Rhodophyta) in the Yasumuro River, Kamigori, Hyogo Prefecture, Japan, with special reference to variations in river-water discharge // Jpn J. Limnol. 2006. Vol. 67. N 2. P. 127–133.
18. Necchi O., Jr., Carmona J.J. Somatic meiosis and development of the juvenile gametophyte in members of the Batrachospermales sensu lato (Rhodophyta) // Phycologia. 2002. Vol. 41. N 4. P. 340–347.
19. Necchi O., Jr., Oliveira M.C. Phylogenetic affinities of “Chantransia” stages in members of the Batrachospermales and Thoreales (Rhodophyta) // J. Phycol. 2011. Vol. 47. N 3. P. 680–686.
20. Swale E.M.F. The development and growth of *Thorea ramosissima* Bory // Ann. Bot. 1962. Vol. 26. N 1. P. 105–116.
21. Eloranta P., Kwandrans J. Indicator value of freshwater red algae in running waters for water quality assessment // Oceanol. Hydrobiol. St. 2004. Vol. 33. N 1. P. 47–54.

Поступила в редакцию
17.11.2017

Принята в печать
15.12.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

NEW RECORD OF RED ALGA *THOREA HISPIDA* (THORE) DESV. (RHODOPHYTA) IN THE MOSKVA RIVER

A.A. Georgiev, G.A. Belyakova, D.A. Chudaev, M.L. Georgieva, M.A. Gololobova*

*Department of Mycology and Algology, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: semga2001@yandex.ru

In Moscow Oblast *Thorea hispida* (Thore) Desv. was first time recorded at the beginning of the 20th century. Subsequently *T. hispida* was found in the Moskva River within the territory of Moscow City in 2004 where it still occurs. This species is included in the Red List of Russia, the Red List of Moscow Oblast and in the Red Lists of some European countries. In this paper authors present new data on the distribution of *T. hispida* in the Moskva River and discuss some problems concerning the morphology and conservation status of this species.

Keywords: *Thorea hispida*, red algae, Rhodophyta, morphology, conservation status of species, Moskva River, Red List

Сведения об авторах

Георгиев Антон Александрович — канд. биол. наук, доц. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: semga2001@yandex.ru

Белякова Галина Алексеевна — канд. биол. наук, доц. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-49; e-mail: adm-odo@yandex.ru

Чудаев Дмитрий Алексеевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: chudaev@list.ru

Георгиева Марина Леонидовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: i-marina@yandex.ru

Гололобова Мария Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: gololobovama@mail.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 57.589

СБОР БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ СОРБЕНТОВ
НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНА

С.Г. Васильева*, К.А. Шибзухова, А.С. Морозов, Е.С. Лобакова

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*email: vankat2009@mail.ru

Целью настоящей работы стала оценка возможности использования сорбентов на основе полиэтиленимина (ПЭИ) для эффективного сбора биомассы микроводорослей (МВ). Серия пористых и нерастворимых полимерных материалов была получена путем сшивания ПЭИ эпихлоргидрином. Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток модельной культуры *Chlorella vulgaris* на сорбентах показали, что уже в течение 3 ч к поверхности сорбентов прикрепляется в среднем 39–75% клеток, при этом на начальном этапе иммобилизации сорбирующая активность полимерных материалов зависит от соотношения ПЭИ и сшивающего агента. Дополнительная кварternизация одного из сорбентов путем алкилирования диметилсульфатом приводила к резкому увеличению его сорбирующей активности в отношении клеток модельной культуры МВ. Изучение процесса десорбции показало, что клетки МВ *Ch. vulgaris* практически необратимо иммобилизуются на поверхности всех изученных сорбентов на основе сшитого эпихлоргидрином ПЭИ.

Ключевые слова: микроводоросли, иммобилизация, сорбенты, сшитые полиэтиленимины, сбор биомассы, полимерные материалы

В настоящее время спрос на биомассу микроводорослей (МВ), а также продукты на их основе неуклонно растет. Применяемые методы сбора МВ дорогостоящи, энергозатратны и трудоемки [1] и определяют в среднем на 20–30% себестоимость биомассы. С другой стороны, зарегистрированные в различных водоемах явления массового развития фототрофных микроорганизмов, в том числе МВ, создают целый ряд проблем. Ежегодно фиксируется около 150 тыс. случаев отравления людей рыбой или другими продуктами, содержащими токсины фототрофных микроорганизмов [2]. Таким образом, поиск новых сорбентов, позволяющих эффективно собирать биомассу как токсичных, так и биотехнологически значимых культур МВ, является актуальной задачей.

Мы предположили, что пористые сорбенты на основе полиэтиленимина (ПЭИ) благодаря содержанию многочисленных аминогрупп на поверхности [3] будут обладать высоким сродством к поверхностным структурам МВ и таким образом обеспечивать их быстрое и устойчивое прикрепление.

Целью настоящей работы стали синтез сорбентов на основе ПЭИ, обеспечивающих высокую скорость и полноту сбора биомассы МВ, а также исследование структуры поверхности и сорбционной активности таких сорбентов в отношении модельной культуры МВ.

Материалы и методы

Объект исследования. В качестве модельной была выбрана культура *Chlorella vulgaris* (IPPAS S-2014), культивирование которой проводили по методике, описанной ранее [4].

Получение сорбентов. Сшивку сорбентов на основе ПЭИ проводили при нагревании, используя эпихлоргидрин в различных массовых концентрациях (7,5%; 15%; 30%), далее проводили дегидратацию продукта по аналогии с методикой, описанной в работе Нуждиной и соавт. [5]. При этом были получены пористые нерастворимые сорбенты П-Э30, П-Э15, П-Э7,5 с различным соотношением основных компонентов “ПЭИ:эпихлоргидрин”. Сорбент П-Э30 был дополнительно алкилирован диметилсульфатом, как описано ранее [5], для создания полимера П-КЭ30, содержащего четвертичные аммонийные группы на поверхности.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Для исследования поверхности сорбентов и особенностей прикрепления клеток МВ образцы полимерных материалов готовили, как описано в работе Лобаковой и соавт. [4].

Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток МВ на сорбентах. Изучение кинетики иммобилизации клеток и определение остаточного содержания хлорофилла (Хл) проводили по методике, описанной ранее [4]. Эффективность иммобилизации ($\Theta_{\text{им}}$) клеток МВ на сорбентах определялась по формуле:

$$\Theta_{\text{им}} = (\text{СХл}_1 - \text{СХл}_2) \cdot 100\% / \text{СХл}_1,$$

где $\Theta_{\text{им}}$ — эффективность иммобилизации культуры на сорбенте (%); СХл_1 — содержание Хл в контроле (мг/л); СХл_2 — остаточное содержание Хл в суспензии клеток при иммобилизации в течение определенного интервала времени (мг/л).

Изучение десорбции клеток. Для изучения процесса десорбции образцы полимерных материалов с иммобилизованными клетками погружали в колбы объемом 50 мл, содержащие по 20 мл 0,5 М NaOH или 20%-ного раствора NaCl. Затем колбы помещали в термостатируемый шейкер Innova-44 (New Brunswick, США) и инкубировали в течение 24 ч при 120 об./мин и температуре 25°C. Процесс десорбции контролировали по изменению содержания хлорофилла в суспензии, содержащей открепившиеся от сорбента клетки МВ. Отбор образцов осуществляли через 1, 3 и 24 ч от начала инкубации, для чего отбирали 1 мл суспензии клеток и определяли содержание в ней хлорофилла.

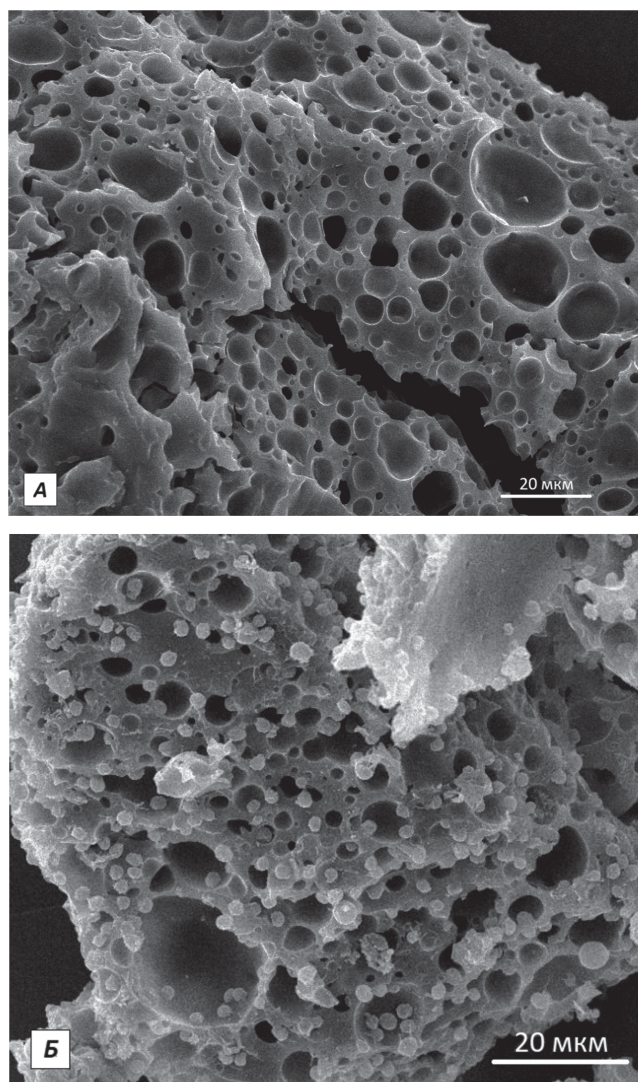


Рис. 1. Микрофотографии поверхности сорбентов и иммобилизованных клеток *Ch. vulgaris*. А — сорбент П-Э30, Б — клетки *Ch. vulgaris*, иммобилизованные на сорбенте П-Э15

Результаты и обсуждение

В настоящее время для получения материалов на основе химически сшитого ПЭИ используют различные сшивающие агенты, в частности, хлорангидрид себаценовой кислоты, терефталевый альдегид, эпихлоргидрин, 1,5-дибромпентан [5–7], позволяющие получать твердые полимерные материалы, обладающие разнообразными физико-химическими свойствами и отличающиеся формой и характером поверхности.

Исследование поверхности сорбентов, проведенное методом СЭМ, показало, что все синтезируемые сорбенты представляют собой частицы несимметричной формы размером от 0,5 до 1,5 см. Они характеризуются наличием макропор диаметром от 2 до 40 мкм (рис. 1, А), при этом их количество зависит от соотношения “ПЭИ:эпихлоргидрин” в составе сорбента. Наибольшая степень пористости характерна для полимера П-Э30 (массовое содержание эпихлоргидрина 30%), обладающего однородной пористой поверхностью. По мере уменьшения количества сшивающего агента количество пор на поверхности сорбентов уменьшается — так, на поверхности сорбента П-Э7,5 (массовое содержание эпихлоргидрина 7,5%) наблюдается чередование участков с гладкой и пористой поверхностью.

Исследование поверхности сорбентов после их инкубации с клетками *Ch. vulgaris* показало, что клетки МВ уже через 3 ч инкубации заселяют значительное количество пор и межпористое пространство на поверхности полимеров (рис. 1, Б). Через 24 ч наблюдается образование однородного монослоя клеток на поверхности всех синтезируемых сорбентов. Известно, что полисахариды, белки и полипептиды, входящие в состав поверхностных структур клеток МВ и имеющие отрицательно заряженные группы (как правило, карбоксильные), эффективно взаимодействуют с поверхностью поликатионных полимеров на основе ПЭИ. Следует добавить, что в водных растворах ПЭИ обладают склонностью к образованию многочисленных межмолекулярных водородных связей, за счет чего прочность связывания ПЭИ с клеточными стенками МВ может увеличиваться [3].

Исследование кинетики иммобилизации клеток МВ на синтезированных полимерных материалах показало, что наиболее эффективным следует считать квартизированный сорбент П-КЭ30 — так, уже в течение 1 ч инкубации содержание неприкрепленных к сорбенту клеток МВ (определенное по остаточному содержанию Хл в среде) снижалось почти в четыре раза по сравнению с его начальной концентрацией в суспензии (рис. 2, А), при этом рассчитанная $\Theta_{\text{им}}$ для сорбента П-КЭ30 составляла 76,4% (рис. 2, Б). Остальные сорбенты со значительно меньшей скоростью сорбировали клетки на начальной стадии процесса иммобилизации — так, например, через 3 ч $\Theta_{\text{им}}$ для сорбентов П-Э30, П-Э15 и П-Э7,5 не превышала 58,2%, в то время

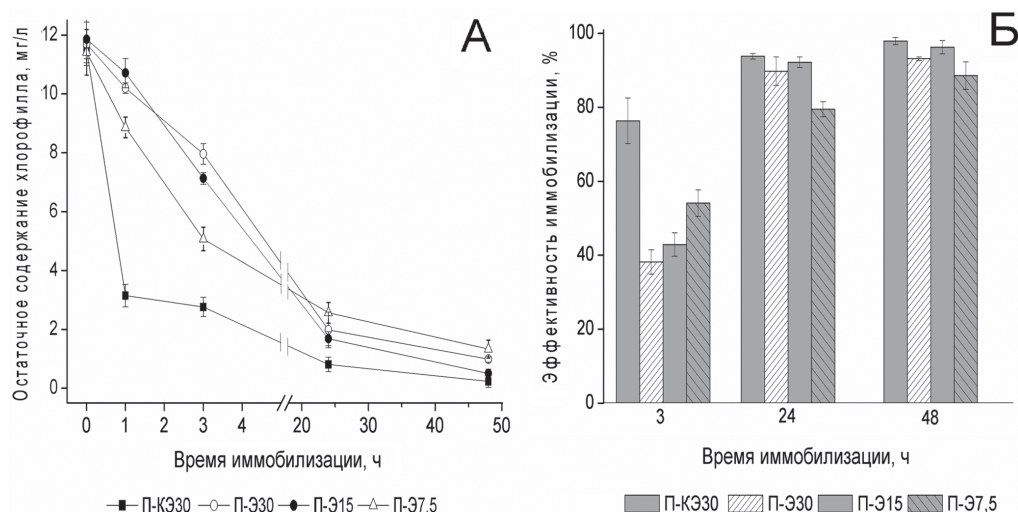


Рис. 2. Оценка кинетики и эффективности иммобилизации клеток *Ch. vulgaris* на сорбентах на основе ПЭИ.

А — кинетика иммобилизации, Б — эффективность иммобилизации

как для квартированного сорбента П-КЭ30 $\Theta_{\text{им}}$ составила около 92,5% (рис. 2, Б).

Следует отметить, что в начальный период иммобилизации (от 1 до 3 ч) отмечалась зависимость $\Theta_{\text{им}}$ сорбентов от соотношения в них основных компонентов “ПЭИ:эпихлоргидрин”. Как видно на рис. 2, снижение количества сшивающего агента в составе сорбента приводило к увеличению количества прикрепленных клеток: через 3 ч инкубации $\Theta_{\text{им}}$ сорбентов с содержанием эпихлоргидрина 30% и 7,5% составляла 39% и 58% соответственно. Указанный эффект может объясняться большим количеством первичных аминогрупп в сорбентах с более низким содержанием сшивающего агента. Именно эти положительно заряженные группы на поверхности сорбентов связываются с отрицательно заряженными карбоксильными и сульфогруппами, входящими в состав компонентов клеточной стенки МВ *Ch. vulgaris*. Через 24 ч инкубации $\Theta_{\text{им}}$ на всех сорбентах составляла от 81 до 94%, а через 48 ч процесс иммобилизации клеток практически завершился (рис. 2).

Таким образом, изучение кинетики иммобилизации клеток МВ на сорбенте П-КЭ30 показало, что использованный прием квартизации сорбента путем присоединения диметилсульфата приводит к существенному увеличению скорости сорбции клеток на поверхности носителя. Чрезвычайно высокая скорость связывания сорбента с клетками МВ в первые часы инкубации, возможно, объясняется наличием в составе сорбента П-КЭ30 четвертичных атомов азота и наибольшей величиной поверхностного заряда, характеризующего этот

сорбент. Сорбенты П-Э30, П-Э15 и П-Э7,5, содержащие только первичные, вторичные и третичные атомы азота, уступали сорбенту П-КЭ30 только на начальном этапе иммобилизации, а через 48 ч $\Theta_{\text{им}}$ всех синтезированных сорбентов на основе сшитого эпихлоргидрином ПЭИ была практически одинаковой (рис. 2, Б).

Для оценки прочности прикрепления клеток *Ch. vulgaris* к поверхности исследуемых поликатионных полимеров изучали процесс их десорбции в растворах NaOH и NaCl. Предполагалось, что электростатические взаимодействия, возникающие между положительно заряженными атомами азота в составе сорбентов и отрицательно заряженными компонентами поверхностных структур клеток *Ch. vulgaris*, должны существенно ослабевать в условиях высоких значений pH и ионной силы раствора. Результаты проведенных экспериментов показали, что значительное увеличение ионной силы среды не приводит к десорбции клеток, а в щелочной среде с поверхности всех изученных сорбентов открепляется не более 12–15% клеток МВ. На основании полученных результатов можно заключить, что клетки *Ch. vulgaris* практически необратимо иммобилизуются на поверхности протестированных полимерных материалов.

Таким образом, можно полагать, что сорбенты на основе сшитых ПЭИ могут быть использованы для эффективной и практически необратимой сорбции клеток фотосинтезирующих микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rao K.K., Hall D.O. Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems // Trends Biotechnol. 1984. Vol. 2. N 5. P. 124–129.

2. Howard A. Toxic cyanobacterial blooms // Environmental toxicology: current developments / Ed. J. Rose. London: Gordon & Breach Science Publishers, 1998. P. 345–357.

3. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Сна-
сов С.Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов.
М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.

4. Lobakova E.S., Vasilieva S.G., Shibzukhova K.A., Mo-
rosov A.S., Solovchenko A.E., Orlova A.A., Bessonov I.V.,
Lukyanov A.A., Kirpichnikov M.P. Immobilization of cyano-
bacteria and microalgae on polyethylenimine-based sorbents // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 5. P. 629–639.

5. Nuzhdina A.V., Morozov A.C., Kopitsyna M.N., Stru-
kova E.N., Shlykova D.S., Bessonov I.V., Lobakova E.S.
Simple and versatile method for creation of non-leaching
antimicrobial surfaces based on cross-linked alkylated poly-
ethylenimine derivatives // *Mater. Sci. Eng.* 2017. Vol. 70.
Part 1. P. 788–795.

6. Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Hypercrosslinked
polymers: basic principle of preparing the new class of poly-
meric materials // *React. Funct. Polym.* 2002. Vol. 53. N 2–3.
P. 193–203.

7. Giffin G.A., Castillo F.Y., Frech R., Glatzhofer D.T.,
Burba C.M. Spectroscopic investigation of proton-conducting,
crosslinked linear poly(ethylenimine) hydrochloride mem-
branes // *Polymer*. 2009. Vol. 50. N 1. P. 171–176.

Поступила в редакцию
31.10.2017

Принята в печать
08.12.2017

MICROBIOLOGY

HARVESTING OF MICROALGAE BIOMASS WITH POLYETHYLENIMINE-BASED SORBENTS

S.G. Vasilieva*, K.A. Shibzukhova, A.S. Morozov, E.S. Lobakova

Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*email: vankat2009@mail.ru

The purpose of this work was to investigate the sorbents on the basis of polyethylenimine (PEI) intended for collecting biomass of microalgae (MA). For this purpose, a series of porous and insoluble polymeric materials were synthesized by cross-linking of PEI with epichlorohydrine. The analysis of kinetics and efficiency of immobilization assessed for the model culture *Chlorella vulgaris*, revealed that already within 3 h of incubation, 39–75% of MA cells attached to the surface of tested sorbents. It was shown that on the initial stage of immobilization the sorption activity of polymeric materials depended on the “PEI:crosslinker” ratio. One of the tested sorbents was additionally quaternized by alkylation with dimethyl sulphate resulting in sharp increase of its sorption activity. The estimation of the MA desorption from polymeric surface showed that most *Ch. vulgaris* cells were practically irreversibly immobilized on all tested sorbents based on the PEI cross-linked with epichlorohydrine.

Keywords: *microalgae, immobilization, sorbents, cross-linked polyethylenimines, biomass harvesting, polymeric materials*

Сведения об авторах

Васильева Светлана Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинжене-
рии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: vankat2009@mail.ru

Шибзухова Карина Ахметовна — аспирант кафедры биоинженерии биологического
факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: shibzukhova@rambler.ru

Морозов Алексей Сергеевич — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического
факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: morozovas84@gmail.com

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф., зам. зав. кафедры биоинженерии
биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СЕКРЕЦИЯ ПРОТЕИНАЗ С ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
МИКРОМИЦЕТАМИ РОДА *ASPERGILLUS*А.А. Осмоловский^{1,*}, Е.С. Звонарева¹, В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров²¹Кафедра микробиологии, биологический факультет и ²Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучена активность внеклеточных протеиназ у 11 штаммов разных видов аспергиллов. Сравнение значений энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином позволило отобрать штамм *Aspergillus terreus* 2 в качестве перспективного продуцента фибринолитических протеиназ. Выявлено, что протеазы *A. terreus* 2 проявляют максимальную активность при pH 8,0. Наибольшие значения фибринолитической и общей протеолитической активности, выраженной в E_{Тир} (количество тирозина в мкмольях, освободившегося за 1 мин при гидролизе фибрина или казеина), составили 34,0 и 358,3, соответственно. Максимальная активность протеиназ была выявлена при росте продуцента на среде, содержащей источники только аминного азота (гидролизат рыбной муки и пептон). Однако количество внеклеточного белка и удельная фибринолитическая и общая протеолитическая активность были больше на среде с источниками как минерального, так и аминного азота (гидролизат рыбной муки и нитрат натрия), нежели на среде, содержащей в качестве источников азота гидролизат рыбной муки и пептон.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, аспергиллы, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, плазминоподобная активность, источники азота

Секреция ферментов, гидролизующих труднорастворимые в воде белковые субстраты, — свойство, присущее микромицетам разных экологических и систематических групп [1, 2]. Внеклеточные протеолитические ферменты микромицетов способны расщеплять такие фибриллярные белки как кератин, эластин, коллаген, фибрин, причем активность одной и той же протеиназы по отношению к каждому из них различна. Эффективный лизис фибрина — как основного полимера в сгустке тромба в кровеносных сосудах или мелких полых медицинских устройствах (типа катетеров) — задача, решаемая с помощью тромболитических средств, главными компонентами которых являются фибринолитические ферменты [3]. Протеиназы с фибринолитической (плазминоподобной) активностью образуют многие микромицеты, в частности, представители рода *Aspergillus*. Среди протеиназ, образуемых аспергиллами, встречаются кислые, нейтральные и щелочные, проявляющие максимальную фибринолитическую активность при различных значениях pH. Показано, что такие протеиназы в разной степени обладают неспецифической протеолитической активностью, а именно способностью к гидролизу глобулярных белков [4–8]. Соответственно, эти факторы накладывают ограничения на возможности их применения в медицине (чувствительность к ингибиторам плазмы крови, неспецифичность действия, токсичность и аллергия) и технологии (низкая эффективность тромболитизиса). В связи с этим

в последнее время значительно увеличилось количество исследований, направленных на поиск среди аспергиллов новых продуцентов фибринолитических протеиназ, причем как видов, ранее не изученных в этом отношении, так и известных видов — изолятов конкретных экотопов, для определения их биотехнологического потенциала [4–8].

Целью работы было изучение фибринолитической активности ряда штаммов аспергиллов и отбор активного продуцента фибринолитических протеиназ.

Материалы и методы

Объекты исследования и их поддержание. Использовали штаммы микромицетов *A. alliaceus* 7dN1, *A. flavipes* A17, *A. flavus* 1, *A. fumigatus* D1, *A. niger* 1, *A. nidulans* 203, *A. oryzae* k1, *A. sclerotiorum* 1, *A. sydowii* 1, *A. terreus* 2 и *A. versicolor* 1 из коллекции кафедры микологии и альгологии, а также кафедры микробиологии МГУ, ранее не изученные в отношении образования фибринолитических ферментов. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенной среде Чапека — Докса и сусло-агаре (3°Б). В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в течение 7 сут.

Определение протеолитического потенциала микромицетов. Проявление протеолитической активности определяли при росте аспергиллов в чашках Петри на средах состава (в %): KН₂РO₄ — 0,05, MgSO₄ — 0,025, пептон — 0,5, казеин или бычий

фибрин — 1,0, агар — 1,5. Культивирование проводили в течение 5–7 сут при температуре 28°C. Выявление зон гидролиза осуществляли после добавления в чашки Петри реактива Кумасси бриллиантового голубого G-250 с хлорной кислотой [9]. Протеолитический потенциал микромицета определяли по значению энзиматического индекса, рассчитанного как соотношение диаметров (в мм) колонии с зоной гидролиза и колонии без нее [10, 11].

Условия культивирования и определение протеолитической активности. Отобранный штамм культивировали в глубинных условиях на орбитальной качалке (200 об/мин) в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 2 сут на среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [9], после чего часть полученного посевного материала переносили в среды следующего состава (в %): глюкоза — 3,5, крахмал — 0,1, гидролизат рыбной муки — 0,5, пептон — 0,5, NaCl — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05 (среда №1); глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO_3 — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05 (среда № 2) с последующим культивированием в течение 5 сут.

Активность внеклеточных протеиназ определяли в фильтрате культуральной жидкости при разных значениях pH с фибрином и казеином, приготовленными на 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,0 и 6,0) и 0,1 М буфере Трис-HCl (pH 7,0 и 8,0), как описано ранее [8]. Реакции с субстратами проводили по модифицированному методу Ансона-Хагихары, инкубируя при 37°C 200 мкл культуральной жидкости и 400 мкл 1%-ных суспензии фибрина или раствора казеина, приготовленных на соответствующем буфере, как описано ранее [8, 12]. За единицу активности ($E_{\text{тип}}$) принимали количество мкмоль тирозина, образовавшегося при расщеплении фибрина или казеина в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости. Реакции проводили при постоянном перемешивании в термощейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Hitachi Ltd, Япония). Для расчета общей протеолитической активности строили калибровочную кривую по тирозину.

Определение белка в культуральной жидкости. Концентрацию белка определяли при 280 нм после предварительного осаждения белков культуральной жидкости дезоксихолатом натрия и трихлоруксусной кислотой, как описано ранее [8].

Повторность опытов трехкратная. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Мицелиальные грибы, в частности аспергиллы, характеризуются способностью гидролизовать содержащиеся в окружающей среде полимерные субстраты, в том числе белковые. Введение белковых субстратов в состав агаризованных сред позволяет

судить о проявлении микромицетами протеолитической активности не только качественно, но и количественно, путем нахождения соотношения диаметров колонии с зоной гидролиза и самой колонии (при посеве уколом), т.е. определения энзиматического индекса. Способность образовывать внеклеточные протеолитические ферменты у использованных в работе микромицетов рода *Aspergillus* изучали на двух агаризованных средах: содержащих казеин или фибрин в качестве белкового субстрата. Различия в значениях энзиматических индексов, выявленных для одного штамма, позволяют судить о выраженности протеолитической активности по отношению к глобулярным или фибриллярным белкам, соответственно. Это особенно важно для направленного поиска продуцентов, образующих протеиназы, активные по отношению к фибрину.

В табл. 1 приведены данные протеолитической активности аспергиллов при росте на агаризованных средах с казеином и фибрином. Как видно, среди 11 изученных штаммов наибольшую казеинолитическую активность проявили микромицеты *A. fumigatus* D1, *A. sydowii* 1 и *A. versicolor* 1. Значения энзиматического индекса на среде с казеином у этих штаммов составило больше 2. При этом энзиматический индекс на среде с фибрином был в 2,0–2,3 раза меньше. Величина этого показателя у микромицетов *A. flavus* 1 и *A. sclerotiorum* 1 также на среде с казеином была выше, чем на среде с фибрином, в 1,15–1,2 раза (табл. 1).

Для штаммов *A. alliaceus* 7dN1, *A. flavipes* A17, *A. niger* 1, *A. nidulans* 203 и *A. oryzae* k1 значения энзиматических индексов при росте на средах с казеином и фибрином оказались сопоставимы. По всей видимости, проявление их протеолитической активности не связано со специфичностью образуемых ими протеиназ, они могут гидролизовать глобулярные и фибриллярные белки в равной степени.

Микромицет *A. terreus* 2 также проявлял схожую протеолитическую активность при росте на средах с казеином и фибрином, однако энзиматический индекс микромицета на среде с фибрином был выше, чем у остальных микромицетов (табл. 1). В связи с этим штамм *A. terreus* 2 был отобран для дальнейших исследований.

В табл. 2 показаны результаты определения общей протеолитической и фибринолитической активности *A. terreus* 2. Активность внеклеточных протеиназ этого штамма была изучена в интервале значений pH реакционной смеси 5,0–8,0 с шагом в единицу. Известно, что протеиназы аспергиллов проявляют в этом диапазоне pH наибольшую активность [13]. Из табл. 2 видно, что внеклеточные протеиназы штамма *A. terreus* 2 обладают максимальной активностью при pH реакции 8,0, минимальной — при pH реакции 5,0. Эти данные согласуются с данными, полученными ранее при изучении влияния pH реакции на протеолитическую активность других аспергиллов — *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 [8].

Таблица 1

Протеолитический потенциал аспергиллов при росте на агаризованных средах с казеином и фибрином

Микромицет	Среда с казеином		Среда с фибрином		Энзиматический индекс	
	диаметр колонии, мм	диаметр зоны гидролиза, мм	диаметр колонии, мм	диаметр зоны гидролиза, мм	среда с казеином	среда с фибрином
<i>A. alliaceus</i> 7dN1	43	50	45	52	1,162	1,156
<i>A. flavipes</i> A17	58	64	25	27	1,103	1,080
<i>A. flavus</i> 1	32	40	40	42	1,250	1,050
<i>A. fumigatus</i> D1	19	39	9	10	2,053	1,111
<i>A. niger</i> 1	59	61	59	60	1,034	1,017
<i>A. nidulans</i> 203	59	60	48	49	1,017	1,020
<i>A. oryzae</i> k1	55	63	27	31	1,145	1,148
<i>A. sclerotiorum</i> 1	28	33	45	46	1,179	1,022
<i>A. sydowii</i> 1	11	30	42	44	2,727	1,048
<i>A. terreus</i> 2	13	16	18	22	1,230	1,222
<i>A. versicolor</i> 1	6	16	25	27	2,667	1,080

Таблица 2

Общая протеолитическая и фибринолитическая активность микромицета *A. terreus* 2 при росте на средах № 1 и № 2 (пояснения в тексте)

рН реакции	Общая протеолитическая активность, E _{Тир}		Фибринолитическая активность, E _{Тир}	
	среда № 1	среда № 2	среда № 1	среда № 2
5,0	9,3	45,3	0,4	8,8
6,0	10,5	87,7	3,8	26,3
7,0	27,0	200,1	5,8	32,4
8,0	42,6	358,3	7,6	34,0

Ввиду смешанного типа азотного питания микромицетов, в частности аспергиллов, важным представляется сравнение протеолитической активности при культивировании штамма *A. terreus* 2 на средах с разными источниками азота. Так, на среде, содержащей источники только аминного азота – гидролизат рыбной муки и пептон (среда № 1), общая протеолитическая активность была в 8,4 раза ниже, чем на среде с источниками как аминного, так и минерального азота (гидролизат рыбной муки и нитрат натрия, среда № 2). Фибринолитическая активность внеклеточных протеиназ *A. terreus* 2 была также ниже на среде №1. Значения фибринолитической активности оказались в 4,5 раза меньше при культивировании продуцента на среде № 1, чем при культивировании на среде № 2 (табл. 2). В аналогичной работе с использованием в качестве продуцентов протеиназ *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 было показано, что протеолитическая активность первого микромицета выше на среде № 1, а второго – на среде № 2 [8]. Полученные данные могут сви-

детельствовать о различиях во влиянии источников азота на регуляцию секреции протеиназ этими микромицетами и указывают на важность изучения образования протеиназ микромицетами на средах с разными источниками белкового азота. Максимальные значения общей протеолитической активности у *A. terreus* 2 оказались в 3,7 и 11,2 раза больше, а фибринолитической активности – на 48,3 и 33,2% больше, чем у *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1, соответственно.

Определение содержания белка в культуральной жидкости *A. terreus* 2 показало, однако, что при росте продуцента на среде №1 количество секретируемого белка превышает в 4,5 раза количество белка, выделяемого в среду культивирования при росте на среде № 2, где наблюдалась максимальная протеолитическая активность. Вероятно, при росте на богатой среде микромицет продуцирует и другие внеклеточные ферменты. Значения удельных фибринолитической и общей протеолитической активности протеиназ *A. terreus* 2 также были больше на среде № 1, чем на среде № 2.

Одним из показателей эффективности протеиназ по отношению к гидролизу фибриллярных белков является соотношение фибринолитической и общей протеолитической активностей (соотношение ФА/ОПА) [8, 9, 14]. Для микромицета *A. terreus* 2 это соотношение составило 0,18 при росте на среде № 1 и 0,09 при росте на среде № 2 (рисунок). Аналогичные значения были получены при расчете соотношения указанных активностей на мкг белка. Такие различия, полученные при росте микромицета на средах с разными источниками азота, подтверждают высказанное ранее предположение о возможности управлять этим соотношением, изменяя

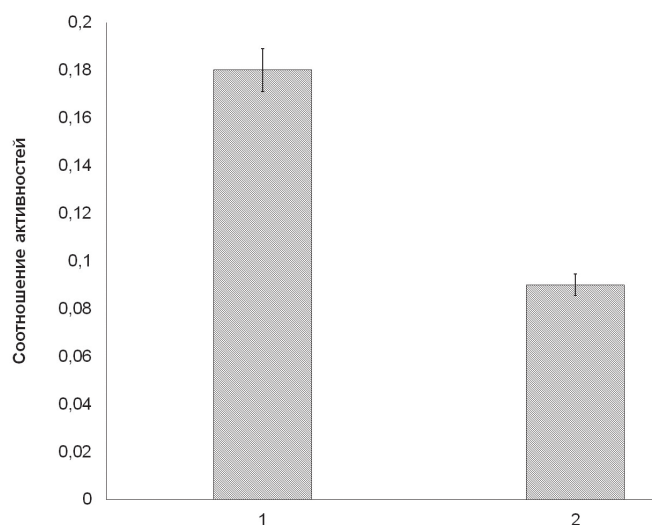


Рисунок. Соотношение показателей фибринолитической и общей протеолитической активности (на мг белка). 1 — на среде № 1, 2 — на среде № 2 (пояснения в тексте)

источники азотного питания в составе среды, что может привести к получению более активных по отношению к фибриллярным белкам протеиназ [8]. Сходные значения ФА/ОПА были получены и

для другого микромицета — *A. ochraceus* L-1, известного продуцента протеиназ с фибринолитической и активаторной по отношению к белкам системы гемостаза активностью [15, 16].

Полученные данные указывают на значительный биотехнологический потенциал микромицета *A. terreus* 2 как продуцента протеиназ с фибринолитической активностью.

Таким образом, среди 11 штаммов разных видов аспергиллов по значениям энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином в качестве перспективного продуцента фибринолитических протеаз был отобран микромицет *A. terreus* 2. Показано, что протеазы *A. terreus* 2 проявляют максимальную активность при pH реакционной смеси 8,0. Наибольшие значения фибринолитической ($34,0 E_{\text{Тир}}$) и общей протеолитической ($358,3 E_{\text{Тир}}$) активности были выявлены при росте продуцента на среде, содержащей источники аминного азота, однако количество внеклеточного белка и удельные фибринолитическая и общая протеолитическая активность были больше на среде с источниками минерального и аминного азота, нежели на среде, содержащей только аминные источники азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi // *Biotechnol. Prog.* 2014. Vol. 30. N 3. P. 656–672.
2. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // *Microbiology.* 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
3. Balami J.S., Chen R., Sutherland B.A., Buchan A.M. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2013. Vol. 12. N 2. P. 145–154.
4. Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities // *Microbiology.* 2001. Vol. 70. N 5. P. 519–522.
5. Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // *Biologia.* 2015. Vol. 70. N 12. P. 1565–1574.
6. Aradhya P.K., Chavan M.D. Production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus niger* // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 3. N 9. P. 843–851.
7. Yadav S., Siddalingeshwara K.G. Screening and biosynthesis of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum* // *J. Drug Deliv. Therap.* 2015. Vol. 5. N 6. P. 60–62.
8. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
9. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // *Microbiology.* 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
10. Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // *Int. J. Microbiol.* 2012. Vol. 22. Article ID 578925.
11. Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi H.N. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from angrove soil of Mahanadi river delta and their cellulose production ability // *Am. J. Microbiol. Res.* 2014. Vol. 2. N 1. P. 41–46.
12. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. Гидролитическая система нокардиоформной бактерии *Nocardia minima* в процессе ее роста, развития и дифференциации // *Микробиология.* 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.
13. Nirmal N.P., Shankar S., Laxman R.S. Fungal proteases: an overview // *Int. J. Biotech. Biosci.* 2011. Vol. 1. N 1. P. 1–40.
14. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.
15. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. Vol. 41. N 5. P. 500–505.
16. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Properties of extracellular plasmin-like proteases of *Aspergillus ochraceus* micromycete // *Applied Biochem. Microbiol.* 2017. Vol. 53. N 4. P. 429–434.

Поступила в редакцию
11.09.2017

Принята в печать
12.12.2017

MICROBIOLOGY

SECRETION OF PROTEINASES WITH FIBRINOLYTIC ACTIVITY BY MICROMYCETES OF THE GENUS *ASPERGILLUS*

A.A. Osmolovskiy^{1,*}, *E.S. Zvonareva*¹, *V.G. Kreyer*¹, *N.A. Baranova*¹, *N.S. Egorov*²

¹*Department of Microbiology and* ²*International Biotechnology Center, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, 119234, Moscow, Russia*

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

Proteolytic activity of extracellular enzymes of 11 strains of different *Aspergillus* species was studied. Comparison of the enzymatic indices of strains grown on agar medium with casein and fibrin allowed us to select the strain *A. terreus* 2 as a promising producer of fibrinolytic proteases. It was found that *A. terreus* 2 proteases show maximum activity at pH 8.0. The highest values of fibrinolytic and total proteolytic activities expressed in U_{Tyr} (amount of micromoles of tyrosine released from fibrin or casein for 1 min) were 34.0 and 358.3, respectively. Maximums of activity were detected with when growing the producer on a medium containing only amine nitrogen sources (fish flour hydrolysate and peptone), however, the amount of extracellular protein and the specific fibrinolytic and total proteolytic activity were greater in the medium containing both mineral and amine nitrogen sources (fish flour hydrolysate and sodium nitrate), rather than on a medium containing fish flour hydrolysate and peptone as nitrogen sources.

Keywords: *proteinases of micromycetes, Aspergillus, fibrinolytic enzymes, thrombolytic agents, plasmin-like activity, nitrogen sources*

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru

Звонарева Елена Сергеевна — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: zvonareva.es@gmail.com

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Егоров Николай Сергеевич — докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 591.112.1

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДИАДЕНОЗИНТЕТРАФОСФАТА НА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРЕДСЕРДНОГО И ЖЕЛУДОЧКОВОГО МИОКАРДА КРЫСЫ НА РАННИХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА**К.Б. Пустовит^{1,2}, В.М. Потехина¹, Н.В. Пахомов¹, В.С. Кузьмин^{1,2,*}**

¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12;*

²*Кафедра физиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1*

**e-mail: ku290381@mail.ru*

Диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) является пуриновым соединением, относящимся к группе эндогенных веществ, которые в последнее время рассматриваются как нейротрансмиттеры в вегетативной нервной системе. Ранее было показано, что ДАТФ подавляет сократимость миокарда, а также оказывает модулирующее влияние на адренергические воздействия в сердце взрослых млекопитающих. Однако физиологическая роль ДАТФ в регуляции работы сердца в раннем постнатальном онтогенезе, когда симпатическая иннервация сердца еще остается незрелой, не исследована. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния ДАТФ на биоэлектрическую активность сердца на ранних этапах постнатального развития. Для этого регистрировали потенциалы действия (ПД) с помощью стандартной микроэлектродной техники в многоклеточных перфузируемых изолированных препаратах правого предсердия, левого предсердия и правого желудочка, полученных из сердца крысы в конце первых суток постнатальной жизни, а также на 14-е, 21-е и 60-е сут жизни. ДАТФ вызывал статистически значимое снижение длительности ПД в предсердном миокарде животных всех возрастных групп, использовавшихся в работе. В желудочковом миокарде ДАТФ также приводил к существенному укорочению ПД, однако этот эффект был значимо больше на 21-е и 60-е сут, чем на 1-е и 14-е сут постнатальной жизни. ДАТФ практически не оказывал влияния на ритм в спонтанно активных препаратах правого предсердия, полученных от животных всех исследованных возрастных групп, за исключением животных в возрасте 60 сут. Антагонист пуриновых рецепторов Р2-типа — пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота — подавлял снижение длительности ПД, вызванное ДАТФ в предсердном миокарде крыс, начиная с 21-х сут развития, но не оказывал влияния на эффект ДАТФ с 1-х по 14-е сут постнатального развития. Таким образом, ДАТФ вызывает снижение длительности ПД в предсердном и желудочковом миокарде крысы в раннем постнатальном онтогенезе. В ходе развития указанный эффект ДАТФ усиливается только в желудочковом миокарде, что может быть связано со становлением нервного контроля инотропии этого отдела сердца.

Ключевые слова: диаденозинполифосфаты, диаденозинтетрафосфат, пурины, пуриновые рецепторы, сердце, потенциал действия, постнатальное развитие

Диаденозинполифосфаты (ДАПФ) относятся к широкой группе пуриновых соединений, молекула которых включает два аденозина, соединенных цепью из 2–7 остатков фосфорной кислоты. ДАПФ в последнее десятилетие рассматриваются как эндогенные сигнальные соединения, которые присутствуют во множестве тканей и участвуют в регуляции целого ряда физиологических функций [1].

Показано, что внеклеточные ДАПФ оказывают влияние на работу сердца взрослых животных: подавляют его сократительную активность, вызывают изменение потенциалов действия и ионных токов [2–5]. Поскольку ДАПФ являются пуриновыми соединениями, то их регуляторные эффекты

в миокарде связывают с действием на мембранные рецепторы пуриновых нуклеотидов [6–8]. Известно, что в сердце млекопитающих, в том числе и крысы, присутствуют метаботропные рецепторы Р2Y-типа. Ранее в наших и других работах было показано, что ДАПФ вызывают снижение сократимости миокарда, активируя рецепторы Р2Y-типа [9].

Наличие рецепторов Р2Y-типа в сердце установлено как у взрослых животных, так и у животных, находящихся на ранних этапах постнатального развития [10]. Показано также, что чувствительность к внеклеточным пуриновым нуклеотидам, обусловленная их мембранными рецепторами, появляется уже на ранних стадиях эмбриогенеза [11]. Однако

количество и соотношение различных подтипов рецепторов P2Y в сердце в ходе развития существенно меняются [12]. Результаты предыдущих исследований позволяют предполагать, что влияние пуриновых соединений на работу сердца различно на разных этапах онтогенеза. Тем не менее, онтогенетические аспекты эффектов и механизмов действия пуриновых соединений изучены недостаточно. Также остается неизвестным, каковы эффекты ДАПФ в сердце в раннем онтогенезе.

Согласно современным представлениям, регуляторное влияние пуринов в сердце и других тканях в значительной степени заключается в регуляции симпатических и парасимпатических влияний [13]. Показано, что ДАПФ проявляют свойства нейромедиаторов в вегетативной нервной системе, а основная их роль в сердце может сводиться к ограничению адренергических воздействий [3, 14].

Формирование вегетативного контроля работы сердца происходит в постнатальном онтогенезе. В настоящее время неизвестно, могут ли ДАПФ оказывать влияние на работу сердца на самых ранних этапах развития, когда симпатический нервный контроль еще отсутствует, а также в ходе критического этапа постнатального развития, соответствующего созреванию симпатического звена вегетативной нервной системы. У крыс формирование симпатического контроля работы сердца происходит на 2–3-й нед. развития. Таким образом, наиболее интересным представляется изучение действия ДАПФ в сердце в тот период онтогенеза, который для крысы соответствует временному интервалу с первого дня после рождения и до конца третьей недели постнатальной жизни.

В настоящее время показано, что ДАПФ, цепь остатков фосфорной кислоты которых варьирует от двух до шести, являются физиологически активными. Среди всех ДАПФ диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) имеет среднюю длину цепи остатков фосфорной кислоты. Впервые физиологическая активность была выявлена именно у ДАТФ. Кроме того, ДАТФ вызывает сходные по характеру эффекты в сердце нескольких видов лабораторных животных. Вследствие этого именно ДАТФ был выбран в качестве тестового соединения в данной работе.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием препаратов сердца крысы. Всего было получено 89 препаратов от 89 животных. В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными ("Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей", Страсбург, 1986). Половозрелые самцы и самки крыс стока Wistar (250–300 г, возраст 10 нед.) были получены из питомника "Научный центр биомедицинских технологий" Федерального медико-биологического агентства и использованы

для получения потомства. Животных содержали в виварии в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

В экспериментах использовали препараты сердца, полученные от крыс в конце первых суток постнатального развития (Д1), а также на 14-е, 21-е и 60-е сут (Д14, Д21, Д60) постнатальной жизни. До 21-х сут жизни потомство содержалось с самками в индивидуальных клетках и отбиралось из 7 пометов равномерно, что позволяло получать в каждой возрастной группе животных сходной массы. Крыс в возрасте 60 сут считали взрослыми.

Для выявления действия ДАТФ (Sigma-Aldrich, США) на биоэлектрическую активность сердца регистрировали потенциалы действия (ПД) в изолированных многоклеточных перфузируемых препаратах правого предсердия, левого предсердия и стенки правого желудочка крысы с помощью стандартной микроэлектродной техники согласно процедуре, подробно описанной ранее [9].

Перед экспериментом крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце, выделяли многоклеточные препараты. Препараты помещали в экспериментальную камеру и перфузировали при 37°C оксигенированным (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) раствором Тироде (состав, мМ: NaCl – 129; KCl – 4; NaH_2PO_4 – 20,9; $MgSO_4$ – 0,5; $NaHCO_3$ – 20; $CaCl_2$ – 1,2; глюкоза – 5; pH 7,2–7,4) со скоростью потока 10 мл/мин. Во всех многоклеточных препаратах, за исключением препаратов правого предсердия, потенциалы действия вызывали нанесением электрических стимулов при помощи серебряных электродов, соединенных со стимулятором ЭЛС-2 (частота стимуляции – 3,3 Гц, длительность прямоугольных импульсов – 2 мс, амплитуда импульсов – 3–10 В).

ПД отводили с эндокардиальной стороны многоклеточных препаратов. Для отведения ПД использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивление – 10–30 МОм), подключенные к усилителю Model 1600 Headstage (A-M Systems, США). Усиленный сигнал поступал на АЦП E-154 (L-Card, Россия) и далее обрабатывался на компьютере с помощью программы "Power Graph 3.3" (Ди-софт, Россия). Во всех экспериментах с помощью программы MiniAnalysis 6.0.7. (Synaptosoft, США) оценивали длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД50%, ДПД90%). Так как препараты правого предсердия включали пейсмекерную область и были способны спонтанно ритмически генерировать ПД, то в данном случае оценивали также частоту следования ПД.

После полчасовой адаптации многоклеточных препаратов в перфузионной камере осуществляли запись, которая состояла из двух блоков: запись ПД в контрольных условиях в течение 1 мин; запись ПД при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ либо при одновременном действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ и пиридоксальфосфат-6-азо-

фенил-2',4'-дисульфоновой кислоты (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, PPADS, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 мкМ в течение 10 мин.

Следует отметить, что длительность ПД в контрольных условиях существенно различается в разных отделах сердца, а также существенно меняется в этих отделах с возрастом (рис. 1). Наибольшая длительность ПД в наших экспериментах наблюдалась в препаратах, полученных от животных в конце 1-х сут постнатальной жизни. Поэтому длительность ПД, наблюдаемую при действии ДАТФ, представляли в процентах от контрольного значения для конкретного препарата, полученного от животного конкретного возраста.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью критерия ANOVA (с последующим применением тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми измерениями post-hoc, а также последующим внесением поправки Даннета) после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Уилка.

Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (за исключением рисунков с примерами ПД).

Результаты и обсуждение

В предыдущих исследованиях было показано, что эффекты пуриновых соединений могут существенно изменяться в ходе постнатального развития. При этом может изменяться сам характер реакции на пуриновые нуклеотиды. Хорошо известно, что аденозин является эндогенным агонистом пуриновых рецепторов P1-типа, к которым относятся рецепторы A1- и A2-подтипов. У взрослых крыс аденозин вызывает положительный инотропный эффект в желудочковом миокарде, активируя пуриновые рецепторы A2-подтипа, уровень которых повышается по мере роста животных. Однако в первые недели после рождения аденозин в сердце крыс вызывает негативный инотропный эффект, обусловленный активацией пуриновых рецепторов A1-подтипа, количество которых, соответственно, снижается в ходе постнатального развития. Соответственно, в сердце крыс в первые недели жизни антиадренергический эффект пуриновых соединений, обусловленный активацией рецепторов A1-

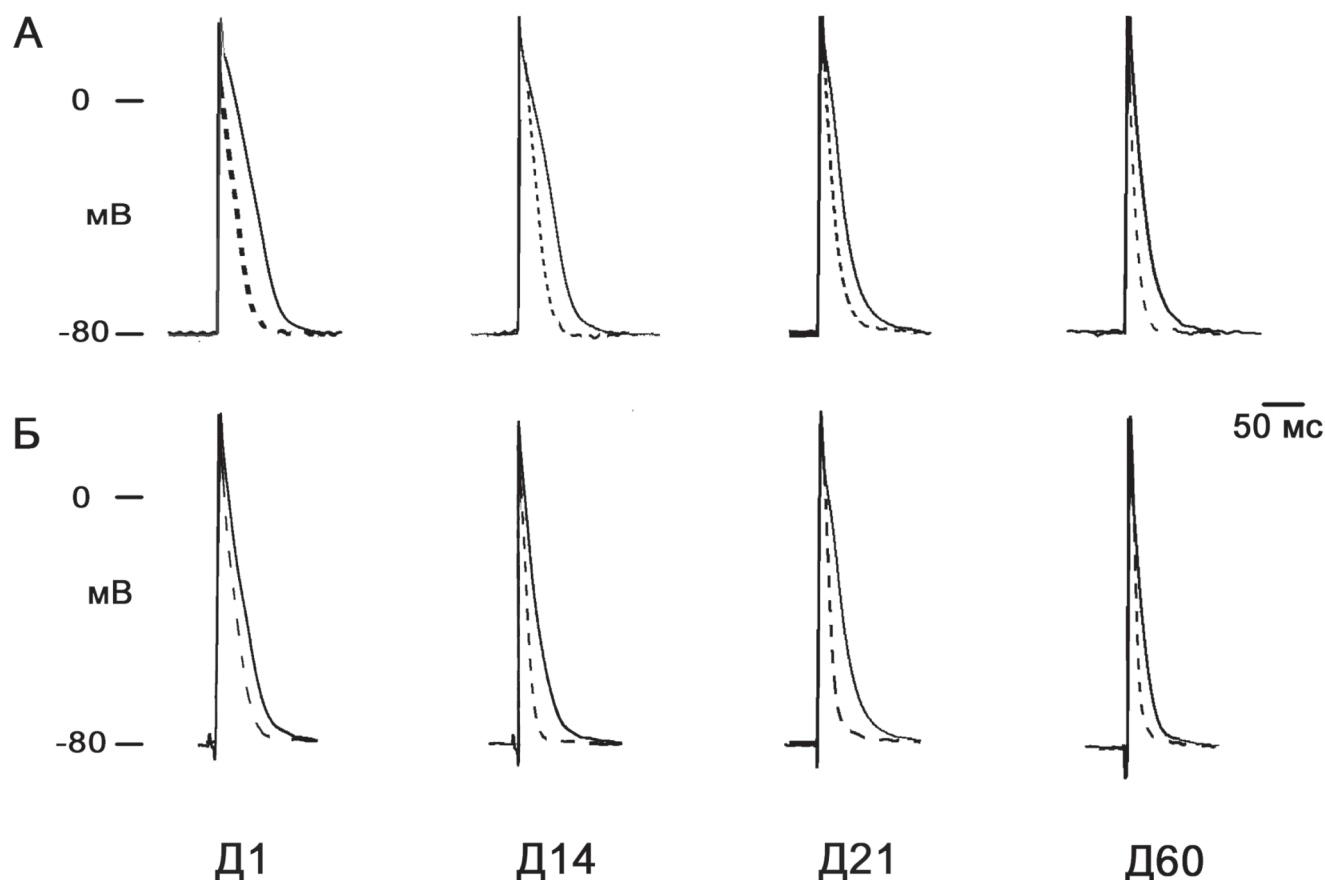


Рис. 1. Репрезентативные потенциалы действия, зарегистрированные в многоклеточных изолированных препаратах правого предсердия (А) и правого желудочка (Б) сердца крысы в контрольных условиях (сплошная линия) и при действии диаденозинтетрафосфата (пунктирная линия) в концентрации 10 мкМ. Д1 – препараты сердца, полученные от животных в конце первых суток постнатального развития; Д14, Д21 и Д60 – препараты, полученные на 14-е, 21-е и 60-е сут постнатального развития. Диаденозинтетрафосфат вызывает укорочение потенциалов действия как в препаратах предсердий, так и в препаратах желудочков, полученных от животных всех исследованных возрастных групп

подтипа, выше, чем у взрослых животных [14–16]. Эффекты в сердце, связанные с действием агонистов рецепторов P2-типа, и, соответственно, активацией рецепторов P2, также различны у животных разного возраста. Так, эндогенный агонист рецепторов P2-типа АТФ оказывает наиболее сильное влияние на сократимость в желудочковом и предсердном миокарде крысы на 21-е сут постнатального развития [17, 18]. Таким образом, данные предыдущих работ позволяли предполагать, что ДАТФ, как физиологически активное вещество, относящееся к группе пуриновых соединений, может оказывать различное влияние на работу сердца у крыс различного возраста.

В наших экспериментах ДАТФ в концентрации 10 мкМ оказывал существенное влияние на ПД во всех исследованных отделах сердца на разных этапах постнатального развития, что показано впервые. Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях, а также при действии ДАТФ в разных препаратах сердца для разных возрастных групп представлены на рис. 1 (А, Б). При действии ДАТФ ДПД90% в левом предсердии составляла $75 \pm 2\%$, $71 \pm 3\%$ и $70 \pm 5\%$ от контрольных значений в препаратах, полученных от животных в конце первых суток, а также на 14-е и 21-е сут постнатальной жизни, соответственно. В левом предсердии, полученном от животных на 60-е сут жизни, ДПД90% при действии ДАТФ составляла $77 \pm 2\%$ от контрольного показателя. В правом предсердии ДПД90% при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ снижалась до $79 \pm 4\%$, $83 \pm 3\%$, $80 \pm 3\%$ и $78 \pm 5\%$ от этого показателя в контрольных условиях для 1-х, 14-х, 21-х и 60-х сут постнатальной жизни, соответственно. Во всех группах описанное влияние ДАТФ на ДПД90% было статистически значимым ($p < 0,05$, $n = 6$).

В желудочковом миокарде ДАТФ в концентрации 10 мкМ вызывал статистически значимое ($p < 0,05$, $n = 6$) снижение ДПД90% до $83 \pm 3\%$ и $80 \pm 3\%$ от контрольной величины в препаратах, полученных от животных в конце 1-х сут и на 14-е сут жизни. В препаратах желудочкового миокарда на 21-е и 60-е сут постнатальной жизни эффект ДАТФ был также статистически значимым. Кроме того, этот эффект был значимо больше ($p < 0,05$, $n = 6$), чем на 1-е и 14-е сут жизни: ДПД90% снижалась до $72 \pm 4\%$ и $72 \pm 4\%$ от контрольных значений, соответственно (рис. 2, А–В).

ДАТФ вызывал снижение длительности ПД на уровне 50% реполяризации. Влияние ДАТФ на ДПД50% и ДПД90% не различалось статистически значимо во всех препаратах, полученных от животных всех возрастов за исключением влияния на длительность в правом предсердии у животных на 60-е сут (рис. 2). В данном единственном случае снижение ДПД50%, вызванное ДАТФ, было гораздо больше, чем снижение ДПД90% ($p < 0,05$, $n = 6$).

Итак, результаты данной работы позволяют утверждать, что ДАТФ вызывает снижение дли-

тельности ПД — параметра, который в значительной степени определяет инотропное состояние миокарда. ДАТФ снижает длительность ПД не только в сердце взрослых (на 60-е сут жизни) крыс, но также и в сердце животных в раннем постнатальном онтогенезе (в период от окончания первых суток после рождения до 21-х сут постнатальной жизни). Величина эффекта ДАТФ (укорочение ПД) в предсердном миокарде сходна у животных всех исследованных возрастных групп. В противоположность ситуации в предсердном миокарде, эффект ДАТФ в желудочковом миокарде оказался большим на 21-е и 60-е сут, чем на 1-е и 14-е сут жизни. Такая особенность действия ДАТФ характерна для длительности ПД как на уровне 50%, так и на уровне 90% реполяризации. Данный факт может указывать на то, что ДАТФ играет более значимую роль как нейротрансмиттер или паракринный фактор именно в желудочковом миокарде тогда, когда сформирован симпатический контроль работы сердца.

В контрольных условиях собственный ритм, генерируемый пейсмекером в препаратах правого предсердия, был различен. Для препаратов, полученных от животных в конце первых суток после рождения, ритм составлял $4,44 \pm 0,4$ Гц; от животных на 14-е и 21-е сут жизни — $4,49 \pm 0,3$ и $5,11 \pm 0,3$ Гц, соответственно (рис. 2, Г). В препаратах правого предсердия, которые были получены от животных на 60-е сут, ритм составлял $4,39 \pm 0,5$ Гц. Таким образом, в наших экспериментах наибольший ритм наблюдался на 21-е сут постнатального развития. При действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах правого предсердия, полученных от животных в конце 1-х сут, на 14-е, 21-е и 60-е сут жизни, ритм составлял $4,5 \pm 0,9$, $4,79 \pm 1$, $5,3 \pm 0,6$ и $3,67 \pm 0,9$ Гц, соответственно. Таким образом, ДАТФ не влиял на ритм в период с конца первых суток до 21-х сут постнатальной жизни, однако вызывал статистически значимое ($p < 0,05$, $n = 6$) снижение на 60-е сут, т.е. у животных, которых мы считали взрослыми.

Ранее было показано, что такой хорошо изученный агонист пуриновых рецепторов, как АТФ, увеличивает частоту ритма в сердце крысы на различных этапах постнатального развития [19]. В противоположность АТФ, ДАТФ снижает ритм, генерируемый пейсмекером сердца, но только у взрослых животных. Полученные результаты позволяют сделать несколько предположений: во-первых, вероятно, что эффекты АТФ и ДАТФ реализуются посредством различных мембранных рецепторов и внутриклеточных сигнальных каскадов. Во-вторых, вероятно, что в пейсмекере сердца, в отличие от ситуации с АТФ, функциональные рецепторы, опосредующие эффект ДАТФ, появляются только у животных возрастом 60 сут. Такие различия могут быть связаны с разной физиологической ролью

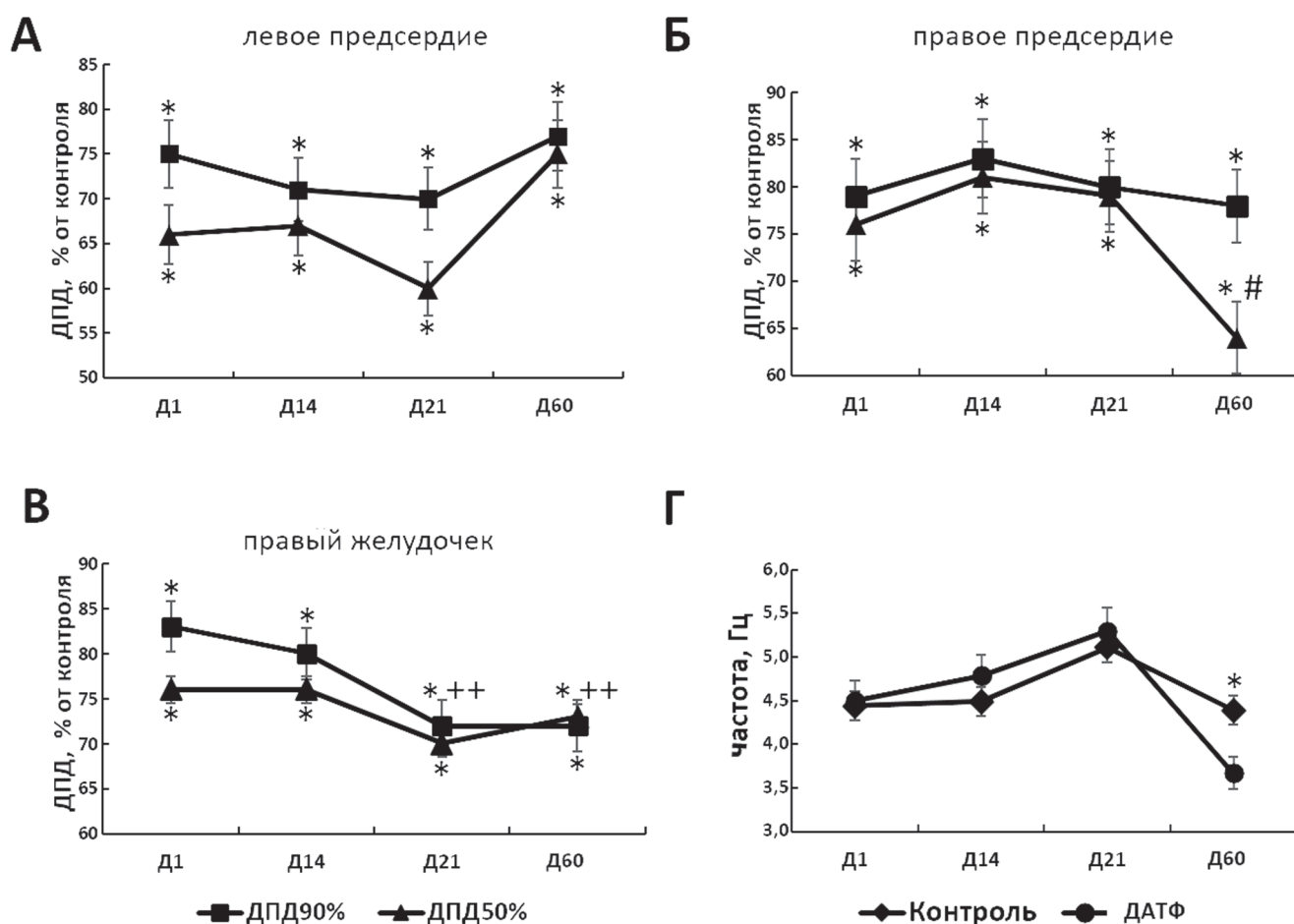


Рис. 2. Влияние диаденозинтрифосфата (ДАТФ) на длительность потенциалов действия (ПД) в предсердном (А, Б) и желудочковом (В) миокарде крысы, а также влияние ДАТФ на частоту генерации спонтанных ПД в многоклеточных препаратах правого предсердия, включающих пейсмекерную область (Г). ДАТФ использовали в концентрации 10 мкМ. Значения длительности потенциалов действия приведены для 50% (ДПД50%) и 90% (ДПД90%) уровня реполяризации. Длительность потенциалов действия в контрольных условиях принята за 100%. * – $p < 0,05$, сравнение длительности ПД при действии ДАТФ с длительностью, наблюдаемой в контрольных условиях; # – $p < 0,05$, попарное сравнение ДПД90% и ДПД50% для каждой возрастной группы; ++ – $p < 0,05$ сравнение длительности ПД, наблюдаемой на 1-е, 14-е или 21-е сут постнатального развития, с длительностью ПД у крыс на 60-е сут развития (ANOVA)

двух пуриновых соединений в регуляции ритма сердца: роль АТФ может сводиться к поддержанию ритма сердца, в то время как функция ДАТФ (и, возможно, других ДАПФ) может заключаться в снижении ритма или ограничении влияния избыточной симпатической стимуляции на ритм у взрослых животных.

На следующем этапе работы нами была исследована роль рецепторов Р2-типа в опосредовании эффектов ДАТФ в сердце в раннем онтогенезе. В наших экспериментах блокатор Р2-рецепторов PPADS вызывал подавление эффектов ДАТФ у животных на 21-е и 60-е сут постнатального развития. При действии ДАТФ в присутствии 100 мкМ PPADS ДПД90% статистически не отличалась от таковой, наблюдаемой только при использовании PPADS в препаратах левого предсердия ($p > 0,1$, $n = 6$, рис. 3). Однако в препаратах, полученных от животных в конце первых суток и на 14-е сут жизни PPADS не подавлял снижение ДПД90%, вызываемое ДАТФ ($p < 0,05$, $n = 6$). Таким образом, у крыс в возрасте 60 сут, которые считались нами взрос-

лыми, а также у крыс на 21-е сут жизни эффекты ДАТФ реализуются через пуриновые рецепторы Р2-типа.

Показано, что пуриновые Р2-рецепторы появляются в различных тканях у млекопитающих уже на плодном этапе развития [20]. В перинатальный период в различных тканях обнаруживаются такие подтипы пуриновых рецепторов, как Р2Y2, Р2Y4, Р2Y6 [10, 21]. Эти подтипы пуриновых рецепторов обнаруживаются в миокардиальной ткани сердца крысы. Хорошо известно, что активация рецепторов Р2Y может приводить к ингибиторным эффектам в сердечнососудистой системе, в том числе вызывать снижение сократимости миокарда [11, 22]. В связи с вышесказанным мы предполагаем, что, как и у взрослых животных, подавление длительности ПД, вызванное ДАТФ у крысят, обусловлено активацией рецепторов Р2Y. Остается непонятным, почему эффекты ДАТФ сохраняются в присутствии PPADS у крыс в период с конца первых суток по 14-е сут постнатального развития. Можно предположить, что данное явление

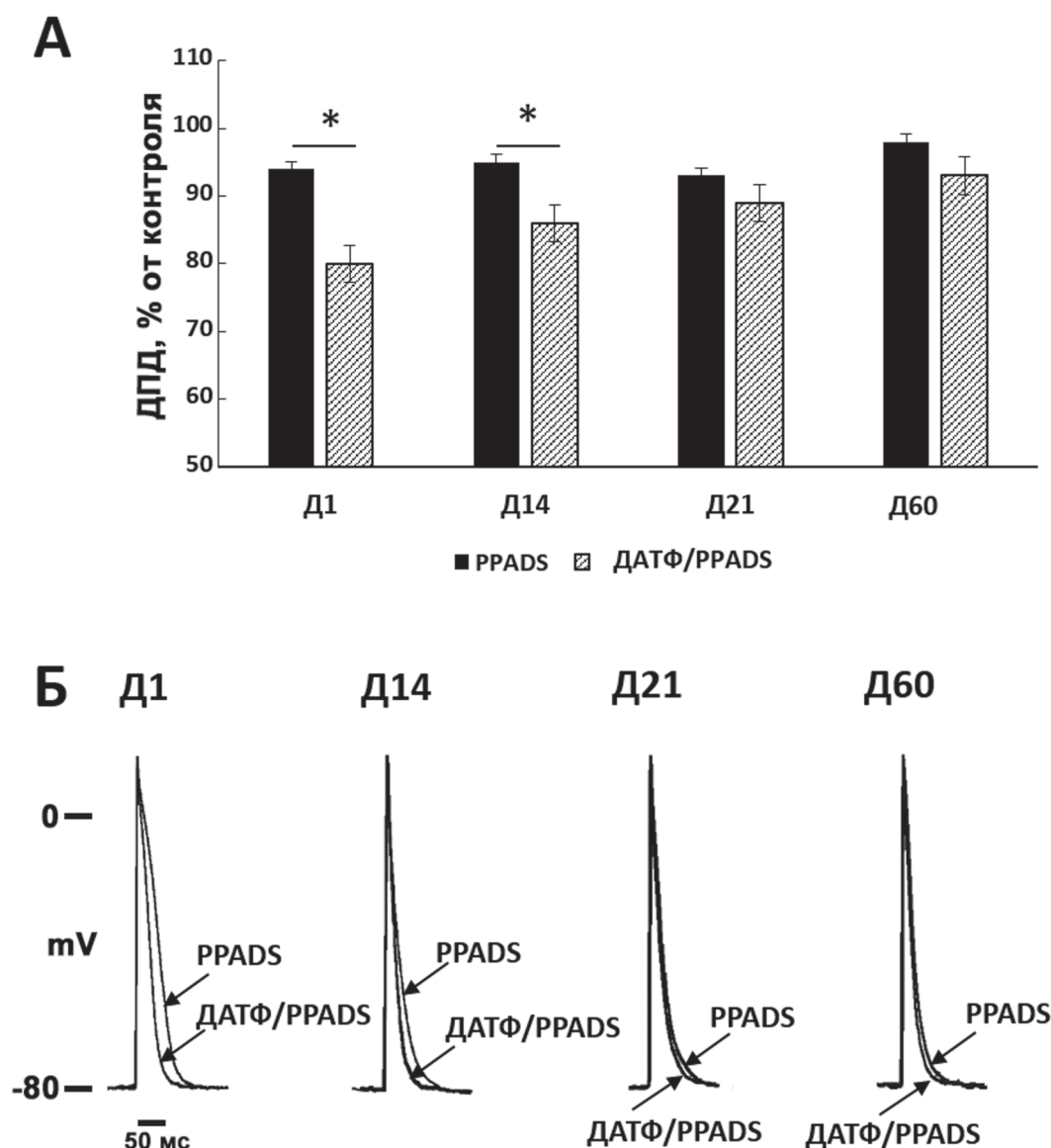


Рис. 3. Влияние блокатора пуриновых рецепторов P2-типа (PPADS) на эффект диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) в предсердном миокарде на ранних этапах постнатального онтогенеза (1–21-е сут постнатального развития) и у взрослых (60-е сутки постнатального развития) крыс. PPADS подавляет эффект ДАТФ начиная с 21-х сут, но не оказывает влияния на эффект ДАТФ в период с 1-х по 14-е сут постнатального онтогенеза. ДАТФ использовали в концентрации 10 мкМ, PPADS — в концентрации 100 мкМ. **А.** Длительность потенциалов действия (ПД) на уровне 90% реполяризации при совместном действии ДАТФ и PPADS (ДАТФ/PPADS) в сравнении с длительностью ПД при действии только PPADS; * — $p < 0,05$ (ANOVA). **Б.** Репрезентативные потенциалы действия, зарегистрированные в многоклеточных препаратах левого предсердия крысы при действии ДАТФ на фоне PPADS либо только PPADS. Д1 — препараты сердца, полученные от животных в конце первых суток постнатального развития; Д14, Д21 и Д60 — препараты, полученные на 14-е, 21-е и 60-е сут постнатального развития

ние связано со сниженным сродством PPADS к пуриновым рецепторам новорожденных животных, которые могут иметь специфические физико-химические свойства, например, за счет гетеродимеризации с другими рецепторами.

Полученные данные позволяют полагать, что ДАТФ вызывает снижение длительности ПД в предсердном и желудочковом миокарде крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза. Таким образом, ДАТФ может оказывать влияние на работу сердца в тот период, когда симпатический нервный контроль еще отсутствует. Эффект ДАТФ сходен по величине в предсердном миокарде крыс

всех исследованных возрастных групп, однако в желудочковом миокарде эффект ДАТФ был больше на 21-е и 60-е сут, чем на 1-е и 14-е сут постнатального онтогенеза. Иначе говоря, в желудочковом миокарде эффект ДАТФ был больше в тот период онтогенеза, когда симпатический контроль работы сердца сформирован. Можно предположить, что одна из физиологических ролей ДАТФ заключается в ограничении адренергических стимуляторных воздействий на желудочковый миокард.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00268).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szalata M. Dinucleoside polyphosphates: occurrence, metabolism and function // *Postepy Biochem.* 2001. Vol. 47. N 1. P. 105–113.
2. Abramochkin D.V., Pustovit K.B., Filatova T.S. Effects of diadenosine polyphosphates on inward rectifier potassium currents in rat cardiomyocytes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 153–157.
3. Pakhomov N.V., Pustovit K.B., Abramochkin D.V., Kuz'min V.S. The role of diadenosine pentaphosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as potential nucleotide comediators in the adrenergic regulation of cardiac function // *Neurochem. J.* 2017. Vol. 11. N 1. P. 63–71.
4. Flores N.A., Stavrou B.M., Sheridan D.J. The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system // *Cardiovasc. Res.* 1999. Vol. 42. N 1. P. 15–26.
5. Abramochkin D.V., Karimova V.M., Filatova T.S., Kamkin A. Diadenosine pentaphosphate affects electrical activity in guinea pig atrium via activation of potassium acetylcholine-dependent inward rectifier // *J. Physiol. Sci.* 2017. Vol. 67. N 4. P. 523–529.
6. Hoyle C.H., Ziganshin A.U., Pintor J., Burnstock G. The activation of P1- and P2-purinoreceptors in the guinea-pig left atrium by diadenosine polyphosphates // *Br. J. Pharmacol.* 1996. Vol. 118. N 5. P. 1294–1300.
7. Erlinge D., Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease // *Purinergic Signal.* 2008. Vol. 4. N 1. P. 1–20.
8. Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81. N 2. P. 767–806.
9. Pustovit K.B., Kuzmin V.S., Abramochkin D.V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2016. Vol. 389. N 3. P. 303–313.
10. Cheung K.K., Ryten M., Burnstock G. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development // *Dev. Dyn.* 2003. Vol. 228. N 2. P. 254–266.
11. Burnstock G., Dale N. Purinergic signalling during development and ageing // *Purinergic Signal.* 2015. Vol. 11. N 3. P. 277–305.
12. Webb T.E., Boluyt M.O., Barnard E.A. Molecular biology of P2Y purinoreceptors: expression in rat heart // *J. Auton. Pharmacol.* 1996. Vol. 16. N 6. P. 303–308.
13. Pelleg A., Katchanov G., Xu J. Autonomic neural control of cardiac function: modulation by adenosine and adenosine-5-triphosphate // *Am. J. Cardiol.* 1997. Vol. 79. N 12. Suppl. 1. P. 11–14.
14. Neumann J., Meissner A., Boknik P., Gombosová I., Knapp J., Lüß H., Müller F.U., Schlüter H., Zidek W., Rolf N., Van Aken H., Vahlensieck U., Schmitz W. Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate in isolated canine cardiac preparations // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999. Vol. 33. N 1. P. 151–156.
15. Sawmiller D.R., Fenton R.A., Dobson J.G., Jr. Myocardial adenosine A1-receptor sensitivity during juvenile and adult stages of maturation // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 274. N 2. P. H627–H635.
16. Cothran D.L., Lloyd T.R., Taylor H., Linden J., Matherne G.P. Ontogeny of rat myocardial A1 adenosine receptors // *Biol. Neonate.* 1995. Vol. 68. N 2. P. 111–118.
17. Anikina T.A., Bilalova G.A., Zverev A.A., Sitdikov F.G. Role of P2X and P2Y receptors in rat myocardial contractility during ontogeny // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. Vol. 143. N 6. P. 695–698.
18. Anikina T.A., Zverev A.A., Sitdikov F.G., Anisimova I.N. Interaction of adrenergic and purinergic receptors in the regulation of rat myocardial contractility in postnatal ontogeny // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. Vol. 44. N 6. P. 296–301.
19. Anikina T.A., Sitdikov F.G., Khamzina E.Yu., Bilalova G.A. Role of purinoreceptors in cardiac function in rats during ontogeny // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005. Vol. 140. N 5. P. 483–485.
20. Massé K., Dale N. Purines as potential morphogens during embryonic development // *Purinergic Signal.* 2012. Vol. 8. N 3. P. 503–521.
21. Bogdanov Y., Rubino A., Burnstock G. Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart // *Life Sci.* 1998. Vol. 62. N 8. P. 697–703.
22. Buvinic S., Briones R., Huidobro-Toro J.P. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed // *Br. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 136. N 6. P. 847–856.

Поступила в редакцию
09.11.2017

Принята в печать
14.12.2017

PHYSIOLOGY

EFFECTS OF EXTRACELLULAR DIADENOSINE TETRAPHOSPHATE ON ACTION POTENTIALS IN ATRIAL AND VENTRICULAR MYOCARDIUM OF THE RAT HEART DURING EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

K.B. Pustovit^{1,2}, V.M. Potekhina¹, N.V. Pakhomov¹, V.S. Kuzmin^{1,2,*}

¹Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Physiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov st. 1, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: ku290381@mail.ru

Diadenosine tetraphosphate (Ap4A) belongs to a wide group of naturally-derived endogenous purine compounds that have been recently considered as new neurotransmitters in autonomic nervous system. It has been shown that Ap4A induces inhibitory effects and modulate adrenergic control in the heart of adult mammals. Nevertheless, the physiological significance of

Ap4A in early postnatal development, when sympathetic innervation remains yet immature, has not been investigated. The aim of the present study was to elucidate the effects Ap4A on heart bioelectrical activity in early postnatal ontogenesis. Action potentials (AP) were recorded with use of standard microelectrode technique in multicellular isolated right atrial (RA), left atrial (LA) and ventricle (RV) preparations from male Wistar rats at postnatal day 1, 14, 21 and, also, from 60-day animals which were considered as adult. The application of Ap4A caused significant reduction of AP duration in atrial (RA and LA) preparations from rats of all ages. Also, Ap4A caused significant AP shortening in RV preparations from rats of various ages, however, the effect was more pronounced in 21-day and adult rats. Ap4A failed to alter automaticity of RA preparations from rats at postnatal day 1, 14, 21 and weakly decreased spontaneous rhythm in RA preparations from the adult rats. The effect of Ap4A was partially abolished by P2-receptor blocker PPADS in LA preparations from both 21 day and adult rats, while failed to suppress Ap4A-caused AP shortening in preparations from 1- and 14-day animals. Thus, extracellular Ap4A causes shortening of AP both in the atrial and ventricular myocardium in early postnatal ontogenesis and adult rats. The effect of Ap4A depends on age only in ventricular myocardium where it may be attributed with growing contribution of diadenosine polyphosphates to the control of myocardium inotropy.

Keywords: *diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate, purines, purine receptors, heart, action potential, postnatal development*

Сведения об авторах

Пустовит Ксения Борисовна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, мл. науч. сотр. кафедры физиологии РНИМУ имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Потехина Виктория Маратовна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: vm-karimova@yandex.ru

Пахомов Николай Владимирович — студент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ncklpakhomov@mail.ru

Кузьмин Владислав Стефанович — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, вед. науч. сотр. кафедры физиологии РНИМУ имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ».

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: «введение», «материалы и методы», «результаты», «обсуждение результатов», «выводы», «список литературы». Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но даже в этом случае они должны содержать резюме и ключевые слова. Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, 12 кегль, междустрочный интервал — полуторный), включая список литературы. На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК. В следующих строках приводятся: название работы, инициалы и фамилии авторов, наименование подразделения биологического факультета МГУ, e-mail автора, ответственного за переписку с редакцией. Далее следуют резюме статьи на русском языке (100–250 слов) и ключевые слова (6–10). После текста статьи на отдельной странице печатается резюме на английском языке с заглавием и ключевыми словами (полный перевод русской версии). На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью, научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (2–3 таблицы или рисунка с соответствующим уменьшением объема текста). Подписи к рисункам и фотографиям даются на отдельной странице в конце рукописи, они должны содержать расшифровки всех используемых сокращений, а рисунки и таблицы — иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (рис. 1, табл. 2). Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов (разрешение должно быть не менее 300 точек на дюйм), не допускается вставка рисунков и фотографий в основной текст. Таблицы печатаются на отдельных страницах в конце рукописи. Каждая графа таблицы должна иметь заголовок.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При ссылке на несколько источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) включает от 10 до 25 ссылок, оформленных следующим образом:

- 1) **Книга:** *Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age.* Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.
- 2) **Статья в сборнике:** *Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Ed. by J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.*
- 3) **Статья в журнале:** *Hayflick L. Progress in cytogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.*
- 4) **Тезисы докладов (материалы) конференции:** *Болеева Г.С., Борзых А.А. Механизмы повышения адрено-реактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.*
- 5) **Автореферат диссертации:** *Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар, 2012. 23 с.*
- 6) **Электронный ресурс:** Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).
- 7) **Электронная публикация:** *Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).*

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ). Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании. При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны курсивом соответствующие латинские названия (род, вид) согласно Международным кодексам номенклатуры.

Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования. Не принимаются к печати работы, которые уже опубликованы или отправлены на печать в другие издания.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Рукописи после рецензирования отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 2 недели, в противном случае статья будет рассматриваться как вновь поступившая.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Тел. 8-495-938-27-01.

С полным текстом правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала — vestnik-bio-msu.elpub.ru.