

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 75 • № 3 • 2020 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Шамрайчук И.Л., Белякова Г.А., Еремина И.М., Кураков А.В.,
Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. Протеолитические ферменты грибов
и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального
действия 123

Оригинальные исследования

- Воробьева Н.В., Черняк Б.В. NADPH-оксидаза модулирует Ca^{2+} -зависимое
образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. 131
- Чурсина М.А., Негрбов О.П. Морфологические тенденции в морфометрии
ног в семействе Dolichopodidae (Diptera) 138
- Антонова Е.П., Илюха В.А., Калинина С.Н. Влияние фотопериодических
условий Северо-Запада России и экзогенного мелатонина
на физиолого-биохимические показатели сирийского хомяка
(*Mesocricetus auratus*). 145
- Баженов М.С., Черноок А.Г., Дивашук М.Г. Молекулярный анализ генов
сигнального пути гиббереллинов у ржи посевной (*Secale cereale* L.) 153
- Осмоловский А.А., Орехова А.В., Конти Э., Крейер В.Г., Баранова Н.А.,
Егоров Н.С. Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ
Aspergillus ochraceus L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью . . 158
- Волох О.И., Армеев Г.А., Трифонова Е.С., Соколова О.С. Исследование
влияния одонитового разрыва на механические параметры ДНК методом
молекулярной динамики. 164
- Малюченко Н.В., Кошкина Д.О., Коровина А.Н., Герасимова Н.С.,
Кирпичников М.П., Студитский В.М., Феофанов А.В. Влияние
госсипола на структуру нуклеосом 170
- Никишова Е.Р., Радченко И.Г., Белевич Т.А. Мелкие фототрофные
флагелляты Белого моря: сезонная динамика и роль в планктонных
и ледовых сообществах. 176
- Бубнова Е.Н., Грум-Гржимайло О.А., Козловский В.В. Состав и структура
сообществ мицелиальных грибов в донных грунтах Белого моря 182

CONTENTS

Reviews

- Shamraychuk I.L., Belyakova G.A., Eremina I.M., Kurakov A.V.,
Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E. Fungal proteolytic enzymes
and their inhibitors as perspective biocides with antifungal action123

Research articles

- Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NADPH oxidase modulates Ca^{2+} -dependent
formation of neutrophil extracellular traps131
- Chursina M.A., Negrobov O.P. Morphometric variation in leg segments length
in the family Dolichopodidae (Diptera).138
- Antonova E.P., Ilyukha V.A., Kalinina S.N. Effect of photoperiodic conditions
of the North-West Russia and exogenous melatonin on physiological
and biochemical parameters in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). 145
- Bazhenov M.S., Chernook A.G., Divashuk M.G. Molecular analysis
of the gibberellin signaling pathway genes in cultivated rye (*Secale cereale* L.)153
- Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Conti E., Kreyer V.G., Baranova N.A.,
Egorov N.S. Production and stability of a complex preparation of proteinases by
Aspergillus ochraceus L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity158
- Volokh O.I., Armeev G.A., Trifonova E.S., Sokolova O.S. Investigation
of the effect of a single-strand break on the mechanical parameters of DNA
by molecular dynamics method 164
- Malyuchenko N.V., Koshkina D.O., Korovina A.N., Gerasimova N.S.,
Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Effect of gossypol
on nucleosome structure170
- Nikishova E.R., Radchenko I.G., Belevich T.A. Small photosynthetic flagellates
of the White Sea: seasonal dynamics and role in plankton and ice communities176
- Bubnova E.N., Grum-Grzhimailo O.A., Kozlovsky V.V. On the composition
and structure of the community of mycelial fungi in the bottom sediments
of the White Sea.182

ОБЗОР

УДК 579.66

Протеолитические ферменты грибов и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального действия

И.Л. Шамрайчук^{1,2,*}, Г.А. Белякова³, И.М. Еремина²,
А.В. Кураков³, М.А. Белозерский¹, Я.Е. Дунаевский¹

¹Отдел белков растений, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

²лаборатория химико-биологических исследований, Всероссийский художественный научно-реставрационный центр имени академика И.Э. Грабаря, Россия, 105005, г. Москва, ул. Радио, 17, корп. 6;

³кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*e-mail: irashamr@yandex.ru

Обзор посвящен выявлению групп пептидаз, вовлеченных в процессы роста грибов, а также ингибиторов таких пептидаз. Рассмотрены имеющиеся данные по разнообразию, значимости, представленности и особенностям протеолитических ферментов представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Alternaria*. На основе анализа данных сделан вывод, что сериновые, металло- и глутаминовые пептидазы необходимы для роста грибов. Поэтому эти ферменты рассматриваются как перспективные мишени ингибиторов пептидаз, что может служить обоснованием поиска таких ингибиторов и разработки на их основе новых биоцидных средств для защиты объектов искусства от биодеструкторов.

Ключевые слова: пептидазы, ингибиторы, биоциды, грибы-биодеструкторы, патогены, сапротрофы, обзор

Объем литературных данных по грибным пептидазам значителен и включает сведения об их свойствах, структуре, спектре активности и влиянии на нее различных факторов, особенностях секреции и возможностях применения. Однако вопрос о том, какими функциями обладает та или иная грибная пептидаза, во многих случаях, ввиду сложности определения, не рассматривается. В целом известно, что функции пептидаз грибов часто не ограничиваются одним лишь гидролизом белков для питания. В некоторых случаях удалось различными методами (биохимическими, молекулярно-генетическими и микологическими) показать, существенна ли активность определенной пептидазы для роста гриба или она необходима для протекания иных (хотя и связанных с ростом) процессов (например, спорообразования, адаптации, патогенеза).

Несмотря на свои важные биологические функции, пептидазы могут оказывать повреждающее действие на живые системы, гидролизуя белки, необходимые для их функционирования, а поэтому должны находиться под строгим контролем. Существует несколько механизмов контроля чрезмерной активности пептидаз. Наиболее важным среди них является взаимодействие протеолитических ферментов с подавляющими их активность ингибиторами, значительная часть которых представляет собой белковые соединения. Структура ингибиторов,

типы ингибирования, кинетические и термодинамические параметры этого процесса, природа фермент-ингибиторных комплексов весьма разнообразны. Изучение веществ, подавляющих активность пептидаз, началось практически одновременно с открытием этих ферментов. В настоящее время известны сотни ингибиторов пептидаз белковой природы. Исследования этих соединений могут быть перспективными для их использования в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии. Понимание характера взаимодействия с пептидазами является предпосылкой для разработки новых подходов к синтезу синтетических ингибиторов, которые могут впоследствии применяться как лекарственные средства. Причиной ряда заболеваний (эмфиземы легких, эпилепсии, наследственного отека Квинке и синдрома Нетертона) являются нарушения во взаимодействии «пептидаза–ингибитор» [1–4]. Эти патологии можно корректировать введением синтетических или природных ингибиторов пептидаз. Для растениеводства перспективны генетически модифицированные сорта растений, в которых экспрессируются ингибиторы гидролитических ферментов фитопатогенов и насекомых-вредителей [5–7].

Ингибиторы активности или синтеза/секреции грибных пептидаз могут найти применение в качестве биоцидных агентов для подавления роста микромицетов на объектах искусства. Поиск

новых антифунгальных соединений для защиты произведений искусства от биоповреждений, вызываемых микромицетами и приводящих к искажению цвета, разрушению красок и образованию темно-окрашенных пятен, актуален. Используемые в настоящее время антимикробные препараты био-защиты имеют ряд недостатков. Широко применяемое четвертичное аммониевое соединение катамин АБ, несмотря на присущие ему ценные характеристики как биоцида, обладает отдельными нежелательными свойствами, среди которых — зависимость активности от присутствия органических и неорганических веществ [8]. Другое вещество, используемое в реставрационной практике, — нипагин (метилловый эфир параоксибензойной кислоты), — плохо растворяется в воде и не обладает длительным эффектом защиты.

В настоящем обзоре мы рассмотрели накопленный в литературе материал по пептидазам, их особенностям и вовлечению в процессы роста у мицелиальных микроскопических грибов, способных вызывать биоповреждения, а также ингибиторам пептидаз, способным подавлять их рост и выступать в качестве перспективных антифунгальных соединений для создания биоцидных средств.

Пептидазы мицелиальных микроскопических грибов

Пептидазы — ферменты, катализирующие распространенную химическую реакцию гидролиза пептидных связей (CO—NH) белков и расщепляющие белки на пептиды или свободные аминокислоты [9, 10]. Термины протеаза, пептидаза, протеолитический фермент и пептид-гидролаза синонимичны.

По механизму катализа пептидазы делят на следующие группы [11]: пептидазы серинового типа (сериновые пептидазы), содержащие в активном центре серин, вовлеченный в каталитический процесс; пептидазы цистеинового типа (цистеиновые пептидазы), имеющие остаток цистеина в активном центре; эндопептидазы аспартатного типа (аспартатные пептидазы), для каталитической активности которых необходимы 2 остатка аспарагиновой кислоты; металлопептидазы, у которых ион металла (обычно цинк) участвует в каталитическом процессе. Выделяют также группу пептидаз с неизвестным каталитическим механизмом. По новым классификационным схемам различают еще глутаминовые и треониновые пептидазы [10].

Все перечисленные группы пептидаз найдены у грибов. В целом, грибы образуют больше протеолитических ферментов в присутствии сложных белковых источников азота, чем в присутствии низкомолекулярных или неорганических. Образование пептидаз может усиливаться при недостаточном содержании доступных углерод-содержащих веществ, что часто наблюдается

при росте грибов на каменных скульптурах и темпной живописи.

У представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, патогенных для растений и человека, а также часто ответственных за биоповреждения, внеклеточные пептидазы могут являться главными факторами патогенности/вирулентности и отвечать за порчу материальных и художественных ценностей.

Пептидазы микромицетов рода *Aspergillus*

Грибы рода *Aspergillus* — чрезвычайно разнообразная и метаболически гибкая группа микромицетов. Среди них известны как сапротрофы, так и патогены человека и растений. Пристальное внимание к грибам этого рода во многом объясняется активным образованием ими микотоксинов, способных вызывать отравление человека при употреблении в пищу пораженного зерна или микотоксикозы животных при использовании контаминированного корма.

У семи различных видов рода *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. flavus*, *N. fischeri* и *A. fumigatus*) идентифицированы 133 возможные пептидазы [12]. При этом только 25 из них предположительно не были внеклеточными. По мнению авторов работы, некоторые из них могут секретироваться посредством альтернативных (не классических) систем секреции. Согласно результатам сравнительной геномики, наиболее крупную группу генов пептидаз исследованных видов рода *Aspergillus* составляют гены, кодирующие сериновые пептидазы. Протеомные и энзиматические исследования в целом подтверждают эти результаты, так как сериновые пептидазы действительно представляют наиболее крупный класс протеолитических ферментов у видов данного рода.

У *Aspergillus westerdijkiae* по результатам геномного анализа, проведенного Хэном с коллегами [13], наиболее крупной группой пептидаз были сериновые пептидазы (176 генов), а за ними следовали металлопептидазы (103 гена). В значительно меньших количествах были представлены пепсин А-подобные пептидазы (11 генов аспартатных пептидаз), убиквитин-специфичные пептидазы (17 генов цистеиновых пептидаз), а также бета-компонент протеосомы (14 генов треониновых пептидаз).

Aspergillus fumigatus секретировал эндопептидазы, которые могут быть классифицированы как сериновые пептидазы септолизинного и субтилизинового семейств, аспартатные пептидазы пепсинового семейства, а также металлопротеазы двух различных семейств [14, 15].

Уровень секреции пептидаз зависел от типа доступного субстрата. Так, добавление пшеничных отрубей приводило к более сильной индукции пептидаз, чем добавление свекловичного жома. Наиболее широкий спектр пептидаз обнаружен у *Aspergillus flavus*.

Пептидазы микромицетов рода *Penicillium*

Грибы рода *Penicillium* распространены повсеместно и составляют в природе важное экологическое звено деструкторов органических веществ, активно продуцируют антибиотики, микотоксины и другие биологически активные соединения. Известна способность видов этого рода контаминировать зерно и плоды растений.

Показано, что гены пептидаз относятся к наиболее крупной группе генов *Penicillium digitatum*, активируемых при инфекции плодов цитрусовых [16]. Среди пептидаз этого вида выявлены аспаратные эндопептидазы, трипептидил-пептидазы, сериновая пептидаза и карбоксипептидаза S.

Среди представителей рода *Penicillium* известны и сапротрофные экстремофилы-продуценты пептидаз. Обнаружено, что темные пятна на глинистых скалистых поверхностях пещеры Дрины (Малые Карпаты, Словакия) являются результатом развития на них психротолерантного вида *Penicillium glandicola* [17]. Этот вид способен синтезировать протеазы наряду с амилазами и целлюлазами, но не пектиназами или керatinaзами. Исследователи полагают, что *P. glandicola* не патогенен по отношению к растениям, животным или человеку.

Пептидазы микромицетов рода *Trichoderma*

Микромицеты из рода *Trichoderma* – распространенные почвенные сапротрофы, характеризующиеся способностью к быстрому росту на различных субстратах и образованию широкого спектра вторичных метаболитов. Эти признаки обеспечивают им конкурентное преимущество перед другими организмами [18]. Среди видов рода *Trichoderma* – широко известные гиперпродуценты ферментов деградации органических материалов (как природного, так и ксенобиотического происхождения), в том числе хитиназ, участвующих в лизисе мицелия, и целлюлаз. Эти микромицеты используют в качестве биоконтрольных агентов и стимуляторов роста растений, а также в качестве противогрибных культур в пищевой промышленности. Периодически сообщают, что представителей рода *Trichoderma* обнаруживают при биоповреждениях и грибных инфекциях [19]. В целом, несмотря на широкое распространение триходерм, относительно слабо изучен вопрос о связи между образованием ферментов и экологическими особенностями этих грибов.

Внеклеточные пептидазы представителей рода *Trichoderma* могут играть значительную роль в лизисе клеточных стенок фитопатогенных грибов, так как хитин и/или фибриллы β -глюкана (которые являются компонентами клеточных стенок грибов) погружены в белковый матрикс [20]. Показано образование грибами этого рода фер-

мента Prb1 – щелочной сериновой пептидазы с молекулярной массой 31 кДа (pI 9,2), синтезируемой в виде препрофермента. Сериновую пептидазу с такой молекулярной массой секретирует *Trichoderma harzianum* как штамм 101645 (патоген насекомых), так и штамм 206040 (микопаразит, используемый для биологического контроля фитопатогенных грибов) [21].

У штамма *T. harzianum* СЕСТ 2413 идентифицирована аспаратная пептидаза (P6281: молекулярная масса 33 кДа, pI 4,3), индуцируемая в присутствии грибных клеточных стенок [22], в связи с чем авторы предполагают вовлечение этой пептидазы в микопаразитическую активность гриба.

Согласно данным Ландовски с сотр. [23], штамм *Trichoderma reesei* на среде с добавлением экстракта зерна секретирует широкий ряд протеолитических ферментов, среди которых – аспаратные, глутаминовые, а также сериновые (субтилизины- и трипсин-подобные) пептидазы. У *T. reesei* выявлено большое число генов субтилаз (22), что характерно и для некоторых других видов сапротрофных грибов [24]. Авторы полагают, что субтилазы помогают грибам лучше адаптироваться к меняющимся условиям, используя широкий спектр жизненных стратегий.

T. reesei – активный продуцент 4 аспаратных пептидаз: PEP1 (42,7 кДа), PEP2 (42,4 кДа), PEP3 (49 кДа) и PEP5 (45 кДа) [23]. Эти пептидазы обладают 51–64% сходства в аминокислотных последовательностях.

Аспаратная протеиназа была идентифицирована также у *T. asperellum* [25]. Она секретировалась в среде совместных культур «растение–*Trichoderma*». Идентифицирован ген, кодирующий этот фермент.

Итак, способность штаммов рода *Trichoderma* продуцировать пептидазы известна давно, однако их протеолитические системы остаются относительно слабо изученными.

Пептидазы микромицетов рода *Alternaria*

Виды рода *Alternaria* – главным образом сапротрофные микромицеты, часто встречаемые в почве и на отмерших растительных тканях [26]. Ряд видов рода *Alternaria* являются экономически значимыми фитопатогенами, вызывающими болезни зерновых, декоративных, масличных и овощных культур. Некоторые представители образуют микотоксины, с которыми связывают развитие рака у млекопитающих. Споры альтернаний являются одними из распространенных аллергенов.

При изучении микромицетов рода *Alternaria* акцент часто делался на образовании меланинов и секреции специфических токсинов у патогенных видов. Вопрос об образовании пептидаз у этих грибов рассматривался редко [27].

На сегодняшний день пептидазы *Alternaria* spp. привлекают пристальное внимание как сильные аллергены, критичные на ранних стадиях развития астмы [28, 29]. Идентифицирована и охарактеризована щелочная сериновая пептидаза фитопатогенного гриба *A. solani* и подобраны оптимальные условия ее образования [30, 31]. Максимум образования пептидазы в среде, содержащей 1% казеина, был отмечен на 9-е сут. культивирования, когда значение pH среды достигало 8,5; в средах, содержащих индукторы, отличные от казеина, такие как желатин, глицин или глутаминовая кислота, были детектированы низкие уровни пептидаз. Очищенный фермент характеризовался оптимумом pH 9 и оставался активным в диапазоне pH 7–10. Пептидаза обладала широким температурным диапазоном активности и, по мнению авторов, может служить маркером фитопатогенности *A. solani*.

Исследования, проведенные Кришнаном с соавт. [32] на *Zymoseptoria tritici*, патогене пшеницы, показали, что более половины генов секретируемых пептидаз гриба специфично экспрессируются на определенной стадии его жизненного цикла. Для многих грибных паразитов растений установлено большое разнообразие секретируемых пептидаз. Это, возможно, связано и с необходимостью переключения ферментных систем на различные типы субстратов. У фитопатогенов, вызывающих болезни у широкого спектра растений, меньше различий в спектре субстрат-специфической активности при расщеплении белковых субстратов, чем у высокоспециализированных. При развитии микромицетов на произведениях живописи индукторами секреции ими пептидаз служат белки, входящие в состав связующих грунта и красок, а также клеев [33]. Однако конститутивный синтез пептидаз у них также возможен.

Пептидазы, не вносящие заметного вклада в общую протеолитическую активность гриба и выполняющие особые функции, как правило, высокоспецифичны. Напротив, пептидазы, необходимые для роста гриба, часто расщепляют многие пептидные связи в белках, т.е. имеют низкую субстратную специфичность [34].

При этом фермент, кодируемый одним и тем же или сходным геном, у разных видов может выполнять различные функции, что, возможно, связано с занимаемыми экологическими нишами. Так, имеются данные, что отдельные пептидазы, такие как фермент Prb1, ассоциированные с патогенностью гриба-патогена человека *Cryptococcus neoformans*, вносят незначительный вклад в общую секретируемую протеолитическую активность и предположительно обладают очень строгой субстратной специфичностью [34]. В другой работе [35] отмечается, что белок Prb1, предполагаемая субтилизин-подобная протеаза фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica*, обладает множественными функциями и может участвовать в регуля-

ции вегетативного роста и развития гриба, оставаясь при этом фактором вирулентности. Вклад фермента у этого фитопатогена в общую протеолитическую активность был значительным (60%). По-видимому, такие функциональные различия фермента Prb1 связаны с адаптацией этих видов грибов к различным условиям организма-хозяина.

Ингибиторы пептидаз

Пептидазы выполняют необходимые метаболические и регуляторные функции во многих биологических процессах, поэтому необходима тонкая регуляция их активности. Подавление активности пептидаз ингибиторами — очень важный механизм ее регуляции [36, 37]. В качестве ингибиторов пептидаз могут выступать низкомолекулярные соединения, а также белки. Они могут быть классифицированы согласно их источнику происхождения (микробные, грибные, растительные, животного происхождения), структуре (первичной, трехмерной), ингибиторному профилю (широкого действия, специфичные) и механизму реакции (конкурентные, неконкурентные, обратимые, необратимые) [38–40].

Чувствительность к ингибиторам является одним из характерных свойств пептидаз, позволяющим установить их принадлежность к определенному классу [41]. При конкурентном ингибировании ингибитор связывается с активным центром фермента, делая невозможными фермент-субстратные взаимодействия. При неконкурентном ингибировании ингибитор связывается с аллостерическим центром фермента, что приводит к изменению активного центра, становящегося недоступным для субстрата.

К группе низкомолекулярных ингибиторов относится ингибитор сериновых пептидаз фенилметилсульфонилфторид (PMSF), который связывается с ними ковалентно подобно суицидному субстрату [42]. Он плохо растворим в воде, где быстро разлагается (время полураспада около 30 мин). Необратимой инактивации подвергается лишь та часть молекул пептидаз, которые прореагировали немедленно, остальные остаются активными, поэтому реагент необходимо вносить снова.

Некоторые низкомолекулярные вещества действуют на пептидазы различных типов. Лейпептин (0,5 мкг/мл) и TLCK (L-1-хлор-3-(4-тозиламидо)-4-фенил-2-бутанон; 0,1 мг/мл) действуют как против сериновых, так и против цистеиновых пептидаз.

К ингибиторам цистеиновых пептидаз относятся E-64 (N-[N-(L-3-*транс*-карбоксиран-2-карбонил)-L-лейцил]агматин; 0,01 мг/мл) или ингибитор кальпаина I (N-ацетил-Leu-Leu-норлейциналь; 0,01 мг/мл).

Пепстатин А – ингибитор аспартатных пептидаз, проявляющий антимикробные свойства по отношению к *Candida albicans*; показано, что он подавляет пролиферацию и адгезию клеток к абиотическим и биотическим структурам [41].

Действие металлопротеиназ эффективно подавляется в присутствии комплексообразователей, таких как ЭДТА (этилендиаминтетраацетат; 1 мМ) или о-фенантролин [42]. Однако эти вещества инактивируют и все металлозависимые ферменты.

Многие эндогенные ингибиторы протеиназ имеют белковую природу [43]. Количество выделенных и охарактеризованных белковых ингибиторов протеиназ огромно. Большая часть таких ингибиторов обладает активностью по отношению к сериновым протеиназам; белковые ингибиторы металлопротеиназ и аспартатных протеиназ гораздо меньше изучены. α_2 -Макроглобулин может ингибировать пептидазы различных типов.

Группу «канонических» ингибиторов сериновых протеиназ составляют относительно небольшие белки, состоящие из 29–190 а.о. К другим ингибиторам сериновых протеиназ относят серпины (serpins, serine proteinase inhibitors), представляющие группу гомологичных, крупных (глико-) протеинов, в состав которых входит более 400 а.о.

Некоторые представители грибов секретируют ингибиторы пептидаз. Функции грибных ингибиторов пептидаз до конца не определены; возможно, они участвуют в подавлении активности растительных пептидаз, секретируемых при реакции растений на атаку патогенами при фитопатогенезе, или защите пищевых ресурсов от конурирующих организмов [44].

Ингибиторы некоторых пептидаз как ингибиторы роста микромицетов

Для некоторых видов грибов имеются хотя и отрывочные, но ценные сведения о влиянии ингибиторов пептидаз на мицелиальный рост.

Определено, что термофильный непатогенный мицелиальный гриб *Talaromyces emersonii* секретирует кислые пептидазы: РЕР1, аспартатную пептидазу (чувствительную к пепстатину), сходную с другими грибными пепсинами, и TGP1, глутаминовую пептидазу (нечувствительную к пепстатину), которую этот гриб образует в наибольшем количестве [45]. При этом показано, что пепстатин оказывает малое влияние на рост гиф *T. emersonii*, тогда как ингибиторы глутаминовой пептидазы (пептидный аналог ТА1 и пропептидная последовательность РТ1) значительно замедляют рост гриба. Авторы сделали вывод, что рост гиф гриба зависит от активности TGP1, но не РЕР1.

Установлено, что для подавления развития *P. digitatum* на плодах цитрусовых эффективен 1,10-фенантролин, ингибитор металлопептидаз.

Эффект от применения ряда других хелатирующих ионы металлов агентов был меньшим, хотя заметное защитное действие от *P. digitatum* наблюдалось и в присутствии ЭДТА [46].

Антифунгальную активность по отношению к фитопатогенным грибам способны проявлять ингибиторы пептидаз, выделенные из растений. Примером таких ингибиторов может служить ингибитор трипсина типа Кунитца, активный против фитопатогенов *Colletotrichum gloeosporioides* и *Fusarium oxysporum* [47]. Исследователями определен механизм его действия, заключающийся в нарушении целостности мембраны клеток. Неясно, какое действие растительные ингибиторы пептидаз оказывают на сапротрофные грибы. Это предполагает необходимость исследований, связанных с поиском антигрибных соединений, которые могли бы применяться против таких сапротрофных видов, что требуется при проведении, в частности, реставрационных работ.

Сериновые пептидазы и металлопептидазы по результатам геномного и биохимического анализов в большинстве случаев выступают как наиболее часто образуемые микромицетами пептидазы и как ферменты, необходимые для роста грибов. Поэтому они в первую очередь обращают на себя внимание как возможные мишени антигрибных агентов. Интерес представляют также глутаминовые пептидазы; их значительная роль при росте грибов установлена микологическим методом. Важны дополнительные исследования вклада этой группы пептидаз в процесс роста различных видов микромицетов. Пока недостаточно данных об ингибиторах грибных пептидаз, а также о механизме действия и спектре активности таких ингибиторов, хотя их эффективность против роста ряда микромицетов продемонстрирована убедительно. Учитывая специфичность действия ингибиторов пептидаз, мы предлагаем использовать сочетание ингибиторов указанных групп пептидаз при разработке антимикробных препаратов, которые могли бы найти применение в качестве биоцидных средств защиты произведений искусства. Для этого надо провести поиск наиболее эффективных ингибиторов и проверить их действие против широкого спектра известных видов грибов-контаминантов и биодеструкторов. Важно, чтобы ингибиторы не только подавляли рост грибных гиф, но и вызывали гибель спор. Выбор того или иного ингибитора для включения его в комплексный препарат будет зависеть также от результатов исследований его взаимодействия с красочным слоем произведений живописи и другими объектами культуры и искусства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00852_а). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bitoun E., Chavanas S., Irvine A.D., Lonie L., Bodemer C., Paradisi M., Hamel-Teillac D., Ansai S.-i., Mitsuhashi Y., Taïeb A., de Prost Y., Zambruno G., Harper J.I., Hovnanian A. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of *SPINK5* mutations in 21 families // *J. Invest. Dermatol.* 2002. Vol. 118. N 2. P. 352–361.
2. Lehesjoki A.E. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. N 14. P. 3473–3478.
3. Lomas D.A., Loubakos A., Cumming S.A., Belorgey D. Hypersensitive mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency and dementia // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. Vol. 30. N 2. P. 89–92.
4. Ritchie B.C. Protease inhibitors in the treatment of hereditary angioedema // *Transfus. Apheresis. Sci.* 2003. Vol. 29. N 3. P. 259–267.
5. Samac D.A., Smigocki A.C. Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode // *Phytopathology.* 2003. Vol. 93. N 7. P. 799–804.
6. Telang M., Srinivasan A., Patankar A., Harsulkar A., Joshi V., Damle A., Deshpande V., Sainani M., Ranjekar P., Gupta G., Birah A., Rani S., Kachole M., Giri A., Gupta V. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* // *Phytochemistry.* 2003. Vol. 63. N 6. P. 643–652.
7. Khadeeva, N.V., Kochieva, E.Z., Tcherednitchenko, M.Y., Yakovleva E.Yu., Sydoruk K.V., Bogush V.G., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A. Use of buckwheat seed protease inhibitor gene for improvement of tobacco and potato plant resistance to biotic stress // *Biochemistry (Mosc.).* Vol. 7. N 3. P. 260–267.
8. Ребрикова Н.Л. Биология в реставрации. М.: РИО ГосНИИР, 1999. 184 с.
9. Monod M., Capoccia S., Lécenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi // *Int. J. Med. Microbiol.* 2002. Vol. 292. N 5–6. P. 405–419.
10. López-Otin C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 45. P. 30433–30437.
11. Barrett A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases // *Methods Enzymol.* 1994. Vol. 244. N 1. P. 1–15.
12. Budak S.O., Zhou M., Brouwer C., Wiebenga A., Benoit I., Di Falco M., Tsang A., de Vries R.P. A genomic survey of proteases in *Aspergilli* // *BMC Genomics.* 2014. Vol. 15: 523.
13. Han X., Chakraborti A., Zhu J., Liang Z.-X., Li J. Sequencing and functional annotation of the whole genome of the filamentous fungus *Aspergillus westerdijkiae* // *BMC Genomics.* 2016. Vol. 17: 633.
14. Reichard U., Lécenne B., Asif A.R., Streit F., Grouzmann E., Jousson O., Monod M. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72. N 3. P. 1739–1748.
15. Da Silva R.R., de Freitas Cabral T.P., Rodrigues A., Cabral H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation // *Braz. J. Microbiol.* 2013. Vol. 44. N 1. P. 235–243.
16. López-Pérez M., Ballester A.R., González-Candelas L. Identification and functional analysis of *Penicillium digitatum* genes putatively involved in virulence towards citrus fruit // *Mol. Plant Pathol.* 2015. Vol. 16. N 3. P. 262–275.
17. Ogórek R., Dylag M., Kozak B. Dark stains on rock surfaces in Driny Cave (Little Carpathian Mountains, Slovakia) // *Extremophiles.* 2016. Vol. 20. N 5. P. 641–652.
18. Kubicek C.P., Harman G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. CRC Press, 2002. 300 pp.
19. Sandoval-Denis M., Sutton D.A., Cano-Lira J.F., Gené J., Fothergill A.W., Wiederhold N.P., Guarro J. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities // *J. Clin. Microbiol.* 2014. Vol. 52. N 6. P. 2112–2125.
20. Markovich N.A., Kononova G.L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2003. Vol. 39. N 4. P. 341–351.
21. Shakeri J., Foster H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects // *Enzyme Microb. Tech.* 2007. Vol. 40. N 4. P. 961–968.
22. Suárez M.B., Sanz L., Chamorro M.I., Rey M., González F.J., Llobel A., Monte E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease // *Fungal Genet. Biol.* 2005. Vol. 42. N 11. P. 924–934.
23. Landowski C.P., Huuskonen A., Wahl R., Westerholm-Parvinen A., Kanerva A., Hänninen A.-L., Salovuori N., Penttilä M., Natunen J., Ostermeier C., Helk B., Saarinen J., Saloheimo M. Enabling low cost biopharmaceuticals: a systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *Trichoderma reesei* // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. N 8: e0134723.
24. Li J., Gu F., Wu R., Yang J.K., Zhang K.-Q. Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 45456.
25. Viterbo A., Harel M., Chet I. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. Vol. 238. N 1. P. 151–158.
26. Thomma B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite // *Mol. Plant Pathol.* 2003. Vol. 4. N 4. P. 225–236.
27. Шамрайчук И.Л., Кураков А.В., Белозерский М.А., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е. Протеолитическая активность и образование меланина фитопатогенным грибом *Alternaria tomatophila* // *Микол. фитопатол.* 2017. Т. 51. № 6. С. 390–393.
28. Boitano S., Flynn A.N., Sherwood C.L., Schulz S.M., Hoffman J., Gruziova I., Daines M.O. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2 // *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 2011. Vol. 300. N 4. P. 605–614.
29. Matsuwaki Y., Wada K., White T., Moriyama H., Kita H. *Alternaria* fungus induces the production of GM-CSF, interleukin-6 and interleukin-8 and calcium signaling in human airway epithelium through protease-activated receptor 2 // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012. Vol. 158. N 1. P. 19–29.
30. Chandrasekaran M., Sathiyabama M. Production, partial purification and characterization of protease from a

phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer // J. Basic Microbiol. 2014. Vol. 54. N 8. P. 763–774.

31. Chandrasekaran M., Chandrasekar R., Chun S.C., Sathiyabama M. Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. And Mart.) Sor. // J. Biosci. Bioeng. 2016. Vol. 122. N 2. P. 131–139.

32. Krishnan P., Ma X., McDonald B.A., Brunner P.C. Widespread signatures of selection for secreted peptidases in a fungal plant pathogen // BMC Evol. Biol. 2018. Vol. 18. N 7. P. 1–10.

33. Бирштейн В.Я., Голиков В.П., Горин И.П., Гренберг Ю.И., Девина Р.А., Иванов В.А., Косолапов А.И., Лукьянов Б.Б., Наумова М.М., Петушкова Ю.П., Писарева С.А., Ребрикова Н.Л., Таскаева Ю.М., Тоскина И.Н., Цейтлина М.М. Технология, исследование и хранение произведений станковой и настенной живописи. М.: Изобразительное искусство, 1987. 392 с.

34. Clarke S.C., Dumesic P.A., Homer C.M., O'Donoghue A.J., La Greca F., Pallova L., Majer P., Madhani H.D., Craik C.S. Integrated activity and genetic profiling of secreted peptidases in *Cryptococcus neoformans* reveals an aspartyl peptidase required for low pH survival and virulence // PLOS Pathog. 2016. Vol. 12. N 12: e1006051.

35. Shi L., Li R., Bai L., Lu Q., Chen B. Prb1, a subtilisin-like protease, is required for virulence and phenotypical traits in the chestnut blight fungus // FEMS Microbiol. Lett. 2014. Vol. 359. N 1. P. 26–33.

36. López-Otin C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. N 45. P. 30433–30437.

37. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38. Suppl. 1. P. D227–D233.

38. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors // Biochem. J. 2004. Vol. 378. N 3. P. 705–716.

39. Christeller J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability // FEBS J. 2005. Vol. 272. N 22. P. 5710–5722.

40. Rawlings N.D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database // Biochimie. 2010. Vol. 92. N 11. P. 1463–1483.

41. dos Santos A.L.S. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events // World J. Biol. Chem. 2011. Vol. 2. N 3. P. 48–58.

42. Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 328 с.

43. Bode W., Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases // Eur. J. Biochem. 1992. Vol. 204. N 2. P. 433–451.

44. Dunaevsky Y.E., Popova V.V., Semenova T.A., Beliakova G.A., Belozersky M.A. Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use // Biochimie. 2014. Vol. 101. P. 10–20.

45. O'Donoghue A.J., Mahon C.S., Goetz D.H., O'Malley J.M., Gallagher D.M., Zhou M., Murray P.J., Craik C.S., Tuohy M.G. Inhibition of a secreted glutamic peptidase prevents growth of the fungus *Talaromyces emersonii* // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. N 43. P. 29186–29195.

46. Ballester A.R., López-Pérez M., de la Fuente B., González-Candela L. Functional and pharmacological analyses of the role of *Penicillium digitatum* proteases on virulence // Microorganisms. 2019. Vol. 7. N 7: 198.

47. Cai X., Xie X., Fu N., Wang S. Physico-chemical and antifungal properties of a trypsin inhibitor from the roots of *Pseudostellaria heterophylla* // Molecules. 2018. Vol. 23. N 9: 2388.

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.

После доработки 01.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

REVIEW

Fungal proteolytic enzymes and their inhibitors as perspective biocides with antifungal action

I.L. Shamraychuk^{1,2,*}, G.A. Belyakova³, I.M. Eremina²,
A.V. Kurakov³, M.A. Belozersky¹, Y.E. Dunaevsky¹

¹Department of Plant Proteins, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119992, Russia;

²Laboratory of Chemico-Biological Researches, The Grabar Art Conservation Center, ul. Radio 17–6, Moscow, 105005, Russia;

³Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: irashamr@yandex.ru

The review is dedicated to search for peptidase groups responsible for fungal growth and for inhibitors of these peptidases. Available data on diversity, significance, distribution and peculiarities of proteolytic enzymes of fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Alternaria* are discussed. According to analysis of the data we concluded that serine, metallo- and glutamic peptidases are necessary for fungal growth. Thus, these enzymes are considered as perspective targets for inhibitors that may serve as the reason to search for such inhibitors and development of novel biocides on their basis that protect works of art against biodestruction.

Keywords: peptidases, inhibitors, biocides, fungal biodestructors, pathogens, saprotrophs, review

Сведения об авторах

Шамрайчук Ирина Леонидовна — эксперт по технико-технологической экспертизе в лаборатории химико-биологических исследований ВХНРЦ им. академика И.Э. Грабаря, соискатель отдела белков растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-499-763-37-10; e-mail: irashamr@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

Еремина Ирина Михайловна — зав. лабораторией химико-биологических исследований ВХНРЦ имени И.Э. Грабаря. Тел.: 8-499-763-37-10; e-mail: i.m.eremina@grabar.ru

Кураков Александр Васильевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-70; e-mail: kurakov57@mail.ru

Белозерский Михаил Андреевич — докт. биол. наук, зав. отделом белков растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-51; e-mail: mbeloz@belozersky.msu.ru

Дунаевский Яков Ефимович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-51; e-mail: dun@belozersky.msu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

NADPH-оксидаза модулирует Ca^{2+} -зависимое образование нейтрофильных внеклеточных ловушек**Н.В. Воробьева^{1,*}, Б.В. Черняк²**¹*Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40***e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) представляет собой тяжелый наследственный иммунодефицит, при котором пациенты страдают от рецидивирующих бактериальных и грибковых инфекций, а также aberrантных воспалительных процессов. Фенотип ХГБ обусловлен дефицитом фагоцитарной NADPH-оксидазы, приводящим к неспособности фагоцитов образовывать активные формы кислорода (АФК). Такие фагоциты ограничены в возможности осуществлять фагоцитоз, дегрануляцию, а также образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) в ответ на многие рецепторные и фармакологические стимулы. Однако образование ловушек нейтрофилами пациентов с ХГБ в ответ на кальциевые ионофоры было описано нами в предыдущей работе. В ряде работ было показано, что дефицитные по NADPH-оксидазе нейтрофилы не только не могут генерировать АФК, но и благодаря отсутствию электрогенной функции фермента и деполяризации мембраны при активации имеют существенные нарушения притока внеклеточного Ca^{2+} и, как следствие, множественные отклонения в синтезе провоспалительных цитокинов. В настоящей работе мы показали, что образование нейтрофильных ловушек дефицитными по NADPH-оксидазе нейтрофилами в ответ на кальциевый ионофор A23187 сопровождается избыточным накоплением внутриклеточного Ca^{2+} . Такое нарушение мы объясняем отсутствием электрогенной функции мутантной NADPH-оксидазы, которая в норме вызывает деполяризацию плазматической мембраны. Результаты указывают на важную функцию фагоцитарной NADPH-оксидазы как модулятора транспорта внеклеточного Ca^{2+} и могут быть использованы для поиска средств борьбы с таким заболеванием, как ХГБ.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, окислительный взрыв, активные формы кислорода, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NETоз, хроническая гранулематозная болезнь

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) представляет собой наследственный иммунодефицит, при котором фагоциты не образуют супероксид-анион-радикалы (O_2^-) и их производные [1]. Невозможность генерировать супероксид-анион-радикалы связана с дефицитом многокомпонентного ферментного комплекса NADPH-оксидазы [2], что обусловлено мутациями генов, кодирующих его субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox, gp91phox, p22phox и ГТФаза Rac2). Пациенты с ХГБ страдают от рецидивирующих бактериальных и грибковых инфекций, а также aberrантных воспалительных процессов. В связи с этим понимание сигнальных путей, ведущих к развитию фенотипа ХГБ, является важной задачей для поиска средств борьбы с этим недугом.

Ранее было показано, что стимуляция нейтрофилов рецепторными стимулами сопровождается повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , играющего важную роль в активации ряда

эффекторных функций, например, дегрануляции и окислительного взрыва [3]. Наиболее хорошо изученным механизмом, связанным с повышением концентрации Ca^{2+} , является образование инозитол-1,4,5-трифосфата, который, в свою очередь, активирует выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо (эндоплазматический ретикулум) [4]. Истощение Ca^{2+} в хранилищах клетки приводит к активации сенсорных белков STIM1 и STIM2 (stromal interaction molecule) и последующей стимуляции Ca^{2+} -активируемых каналов (CRAC, calcium release activated Ca^{2+} channel), расположенных в цитоплазматической мембране [5]. Активация CRAC-каналов способствует притоку Ca^{2+} внутрь клетки из внеклеточного пространства. После активации нейтрофила хемоаттрактантом *N*-формил-метионин-лейцин-фенилаланином (fMLP), а также активатором протеинкиназы C форбол-12-миристрат-13-ацетатом (ФМА) происходит подавление входа внеклеточного Ca^{2+} . Таким образом, суммар-

ное поступление Ca^{2+} в клетку обеспечивается действием двух конкурирующих механизмов: стимулирующего и ингибирующего.

Учитывая, что функция NADPH-оксидазы в нейтрофилах здоровых доноров заключается в переносе одного электрона с NADPH на молекулярный кислород, в 80-е гг. было высказано предположение, что подавление притока внеклеточного Ca^{2+} при активации связано с электрогенной функцией фермента, приводящей к деполяризации мембраны. Эта гипотеза была доказана в экспериментах на нейтрофилах человека, показавших корреляцию между деполяризацией мембраны и подавлением входа внеклеточного Ca^{2+} в клетки [6]. Было установлено, что у нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с ХГБ и имеющих дефицитную NADPH-оксидазу, такое подавление отсутствует, а накопление Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме происходит значительно быстрее, чем у нейтрофилов здоровых доноров [7].

Будучи «профессиональными» фагоцитами, нейтрофилы обеспечивают «первую линию» защиты от патогенов в очаге воспаления, осуществляя фагоцитоз, дегрануляцию и образование активных форм кислорода (АФК). В 2004 г. в лаборатории А. Циклински [8] был описан новый защитный механизм нейтрофилов, который заключается в высвобождении из клеток деконденсированного хроматина, «декорированного» белками гранул, ядра и цитоплазмы. Такие структуры были названы нейтрофильными внеклеточными ловушками, или NET (Neutrophil Extracellular Traps), поскольку их главная функция состоит в ограничении распространения патогенов из первичного очага воспаления [8]. Следует отметить, что образование NET, как правило, сопровождается гибелью клетки, в связи с чем этот процесс был назван НЕТозом [9].

НЕТоз представляет собой многоступенчатый последовательно развивающийся процесс, при котором происходит образование АФК с участием NADPH-оксидазы и транслокация ферментов азурофильных гранул нейтрофильной эластазы (НЭ) и миелопероксидазы (МПО) в ядро [10]. В ядре, совместно с пептидил-аргинин-деаминой 4 (PAD4), цитруллинирующей гистоны, НЭ и МПО осуществляют деконденсацию хроматина, что приводит к его последующему выбросу за пределы клетки – НЕТозу [11]. Было показано, что при активации НЕТоза также происходит повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [12], и в настоящее время известны две ключевые Ca^{2+} -чувствительные мишени этого процесса: протеинкиназа C, ответственная за фосфорилирование субъединиц NADPH-оксидазы, и PAD4.

В ряде работ было установлено, что нейтрофилы пациентов с ХГБ, помимо невозможности генерировать АФК, также неспособны образовывать NET в ответ на многие рецепторные и фарма-

кологические стимулы (ФМА) [13, 14]. Вместе с тем, дефицитные по NADPH-оксидазе нейтрофилы все же образуют NET в ответ на кальциевые ионофоры иономицин и A23187 при участии митохондриальных АФК (мтАФК) [14, 15].

Мы предположили, что дефицитные по NADPH-оксидазе нейтрофилы не только не способны к генерации оксидаза-зависимых АФК, но и, благодаря отсутствию деполяризации мембраны при активации [7] и избыточному поступлению Ca^{2+} в клетки, имеют более глубокие нарушения агонист-индуцированных сигнальных путей. В соответствии с нашей гипотезой, нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров и пациентов с ХГБ, стимулированные к НЕТозу кальциевым ионофором A23187, должны по-разному отвечать на истощение внутриклеточного Ca^{2+} , что и было проверено в нашей работе.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, fMLP, BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester), люминол (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) были закуплены в Sigma-Aldrich (США); SYBR Green, смола ProLong Gold – в Thermo Fisher Scientific (США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Образцы крови пациентов с хронической гранулематозной болезнью были получены в процессе их планового обследования в Отделении клинической иммунологии и ревматологии Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Образцы крови доноров были получены с их добровольного согласия в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы. Исследования проводили согласно Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Нейтрофилы выделяли из периферической крови с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугаке (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [16]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстране. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе NaCl (0,2%) в течение 30 с и далее восстанавливали физиологический солевой состав путем добавления гипертонического NaCl (1,6%). Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде

(ПКС), включающей RPMI 1640 с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина и 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла более 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4°C перед экспериментом.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Люминол-зависимую ХЛ использовали для оценки концентрации суммарных АФК (внутри- и внеклеточных) как описано ранее [17]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации $2,5 \cdot 10^6$ кл./мл ($4,5 \cdot 10^5$ клеток) инкубировали с ВАРТА-АМ в возрастающих концентрациях в течение 20 мин в условиях 37°C и 5% CO_2 в ПКС (5% ЭТС). Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,7 mM KH_2PO_4 , 8,3 mM Na_2HPO_4 , 10 mM глюкоза, 1 mM CaCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , pH 7,3). К $2 \cdot 10^5$ клеток добавляли люминол (80 мкМ, конечная концентрация) и проводили стимуляцию окислительного взрыва 2,5 мкМ A23187, 30 нМ ФМА или 800 нМ fMLP. Люминол-зависимую ХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37°C в планшетном хемилюминометре Lucy 1 («Anthos Labtec», Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль: стимулированные нейтрофилы; 100%) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET. Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого свежевыделенные нейтрофилы ($2 \cdot 10^5$ кл./мл) адгезировали на круглых покровных стеклах, находящихся в 24-луночном планшете в 500 мкл ПКС (1% ЭТС), в течение 30 мин при 37°C. Нейтрофилы инкубировали в лунках с ВАРТА-АМ в течение 20 мин при 37°C и 5% CO_2 . Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2,5 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции НЕТоза клетки фиксировали в растворе 4%-ного параформальдегида в течение 15 мин. Препараты погружали в SYBR Green, разведенный в фосфатно-солевом буфере в соотношении 1:10000 в соответствии с рекомендацией производителя, и окрашивали в течение 6 мин при комнатной температуре в темноте. Препараты погружали в смолу ProLong Gold и анализировали клетки с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия). Фотографирование проводили с помощью камеры Leica DC300F.

Подсчитывали общее число клеток и число нетотических клеток в каждом поле зрения, и далее оценивали процент НЕТоза в нескольких полях зрения. Для каждого варианта стимуляции

было поставлено не менее 3 экспериментов, а для каждой концентрации ингибитора анализировали не менее 500 нейтрофилов.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием одномерного дисперсионного анализа (ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони для оценки различий между группами. Данные выражали в виде среднего $\pm$ ошибка среднего. Статистически значимые значения p указаны на графиках: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что нейтрофилы, выделенные из образцов крови многих пациентов с ХГБ, обладают повышенным спонтанным НЕТозом, достигающим в некоторых случаях 5–10%. Такое состояние указывало на преактивацию нейтрофилов в организме, ведущую к aberrантному НЕТозу.

Если активация НЕТоза под действием кальциевого ионофора A23187 у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов приводит к избыточному входу Ca^{2+} подобно тому, как это происходит при активации лигандами типа fMLP [6], можно ожидать, что инкубация таких клеток с хелатором внутриклеточного Ca^{2+} ВАРТА-АМ не должна вызывать существенного подавления НЕТоза. Вместе с тем, НЕТоз, индуцированный A23187 у нейтрофилов здоровых доноров, должен быть подавлен ВАРТА-АМ эффективно и дозозависимым способом, что и было проверено в нашей работе.

Диагноз ХГБ у всех исследованных больных был поставлен на основании абсолютного отсутствия у них окислительного взрыва в ответ на зимозан, что было определено методом регистрации люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, а также генетического подтверждения с помощью секвенирования по Сенгеру в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Все больные с ХГБ имели одну из мутаций в гене *CYBB*, кодирующем субъединицу gp91phox (X-сцепленная ХГБ).

С использованием регистрации люминол-зависимой ХЛ мы подтвердили, что у всех пациентов с ХГБ нейтрофилы не образуют АФК в ответ на стимуляцию ФМА, fMLP или A23187, то есть являются полностью дефицитными по NADPH-оксидазе (данные не приведены). Кроме того, такие нейтрофилы не образовывали NET в ответ на ФМА (рис. 1, Д), поскольку для ФМА-индуцированного НЕТоза требуется наличие АФК [13]. Вместе с тем ионофор A23187 инду-

цировал НЕТоз через 4 ч (рис. 1, В, Д). Инкубация нейтрофилов здоровых доноров с ВАРТА-АМ приводила к дозозависимому и эффективному подавлению НЕТоза, индуцированного как А23187, так и ФМА (рис. 1, А, Б), в то время как инкубация дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов с ВАРТА-АМ практически не вела к подавлению выброса хроматина (рис. 1, В, Д).

Мы полагаем, что отсутствие подавления А23187-индуцированного НЕТоза хелатором

ВАРТА-АМ у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов (ХГБ) связано с избыточным входом внеклеточного Ca^{2+} внутрь клетки. При активации нейтрофилов с помощью fMLP происходит быстрое открытие каналов CRAC и последующее закрытие этих каналов, обусловленное деполяризацией мембраны. В нейтрофилах пациентов с ХГБ деполяризация мембраны не происходит и каналы CRAC остаются открытыми, обеспечивая избыточный вход внеклеточного Ca^{2+} [6]. По-

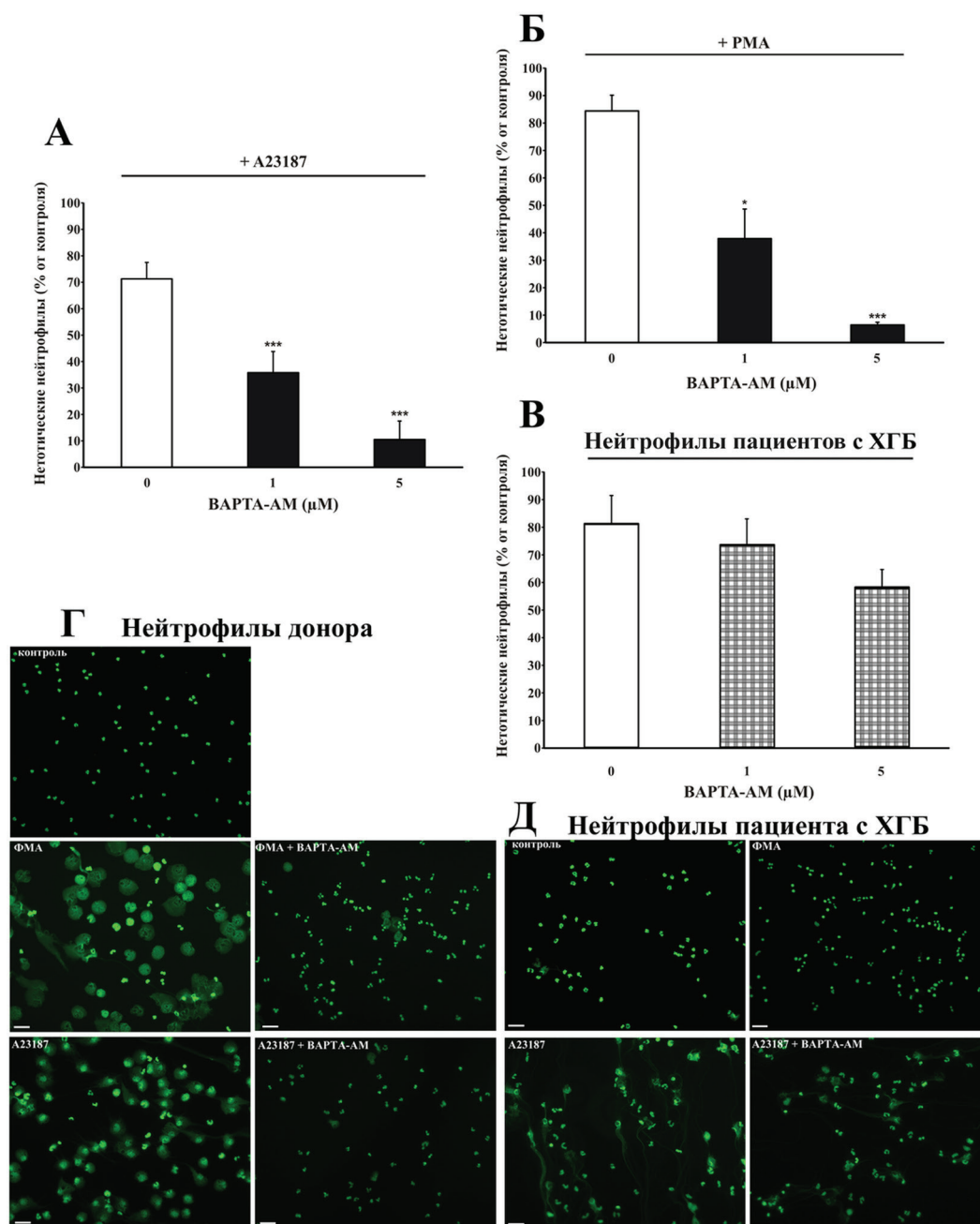


Рис. 1. Действие ингибитора внутриклеточного Ca^{2+} ВАРТА-АМ на ФМА- и А23187-индуцированный НЕТоз

Нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров (А, Б, Г) и пациентов с ХГБ (В, Д), адгезировали на покровных стеклах и далее инкубировали с ВАРТА-АМ в возрастающих концентрациях в течение 20 мин при 37°C. НЕТоз индуцировали А23187 или ФМА в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего для нейтрофилов здоровых доноров (n=3) и нейтрофилов пациентов с ХГБ (n=3). * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$. На фотографиях представлены нейтрофилы здорового донора (Г) и нейтрофилы пациента с ХГБ (Д), прединкубированные с 5 мкМ ВАРТА-АМ в течение 20 мин при 37°C и стимулированные ФМА или А23187. Масштаб – 25 мкм. Увеличение 20 $\times$.

добное открытие каналов CRAC может происходить и под действием A23187 благодаря высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, хотя этот эффект по данным Магомед и Андерсон [18] может быть слабо выражен. Возможно, перенос Ca^{2+} , катализируемый ионофорами, также тормозится при деполяризации мембраны. Однако это может быть связано с тем, что наряду с электронейтральным обменом ионов Ca^{2+} на протоны A23187 и иономицин переносят через мембрану положительно-заряженные комплексы Ca^{2+} [19].

Нам было интересно выяснить, как истощение внутриклеточного Ca^{2+} будет действовать на такую эффекторную функцию нейтрофилов, как окислительный взрыв. В следующей серии экспериментов нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии ВАРТА-АМ в течение 20 мин и далее стимулировали окислительный взрыв A23187, ФМА и рецепторным активатором хемоаттрактантом fMLP. На рис. 2 можно видеть, что ВАРТА-АМ дозозависимо подавлял окислительный взрыв, индуцированный A23187 и fMLP, но не ФМА. Кроме того, ФМА-индуцированный окислительный взрыв происходил с одинаковой интенсивностью как в кальцийсодержащей, так и в безкальциевой среде (данные не приведены). Эти результаты указывают на то, что активация NADPH-оксидазы форболовым эфиром может происходить в отсутствие притока внеклеточного Ca^{2+} , что совпадает с данными других авторов [20], а фосфорилирование субъединиц ферментного комплекса может обеспечиваться Ca^{2+} -нечувствительными изоформами протеинкиназы C (PKC δ , PKC ξ).

Что касается ФМА-индуцированного НЕТо-за, то, вероятно, основной мишенью ВАРТА-АМ в этом сигнальном пути является Ca^{2+} -чувствительный фермент PAD4.

Ранее мы показали [14], что A23187-индуцированный НЕТо-з нейтрофилов здоровых доноров и нейтрофилов, дефицитных по NADPH-оксидазе, происходит с участием митохондриальных АФК (мтАФК). В то же время в нормальных нейтрофилах активация NADPH-оксидазы также была необходима для индукции НЕТо-за. Повидимому, генерация мтАФК существенно повышена при дефиците NADPH-оксидазы. Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют объяснить этот феномен. Повышенный уровень внутриклеточного Ca^{2+} у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов должен стимулировать дегидрогеназы в матриксе митохондрий и дыхание, способствуя усиленному образованию мтАФК. Кроме того, мы установили, что A23187-зависимый нетотический сигнальный каскад происходит при активации митохондриальной поры, mPTP [14]. Повышенное содержание Ca^{2+} в митохондриях нейтрофилов, дефицитных по NADPH-

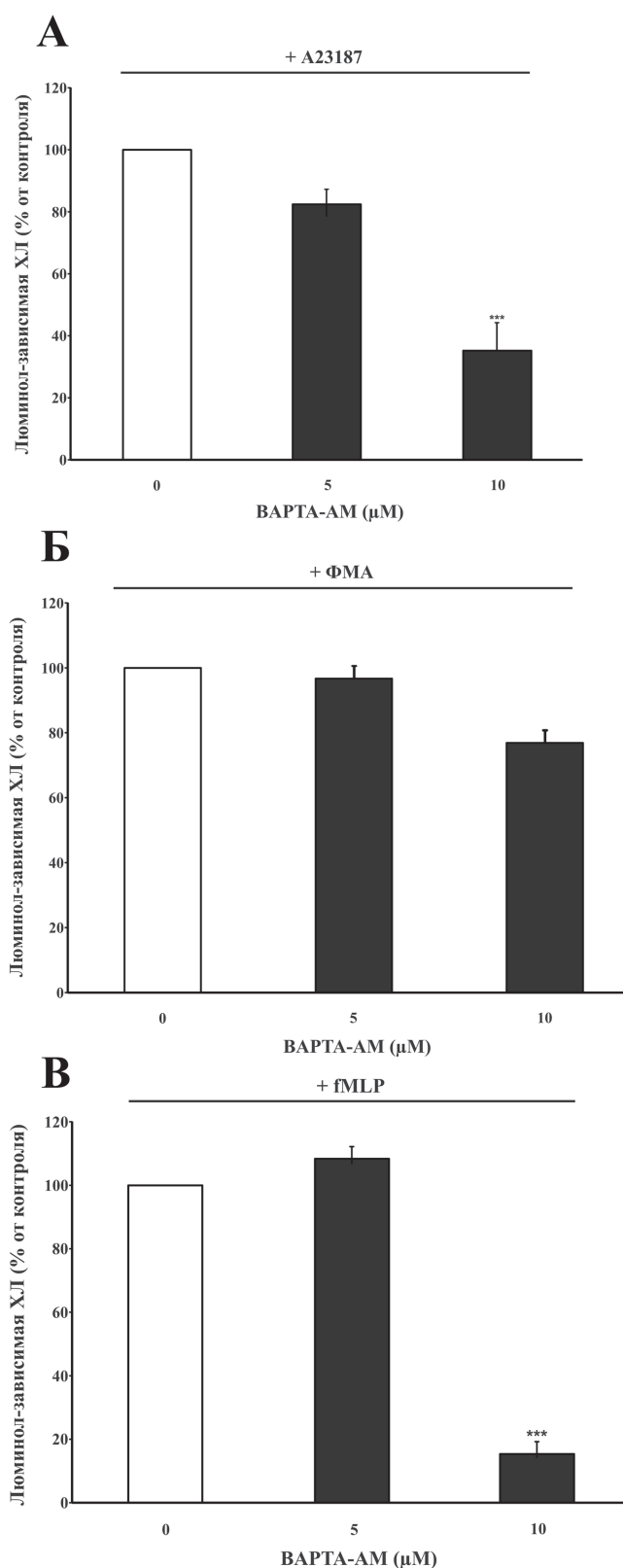


Рис. 2. Оценка окислительного взрыва у нейтрофилов здоровых доноров.

Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в течение 20 мин в присутствии ВАРТА-АМ при 37°C. Далее стимулировали окислительный взрыв 2,5 мкМ A23187 (А), 30 нМ ФМА (Б) или 800 нМ fMLP (В) в присутствии люминола (80 мкМ) и регистрировали хемилюминесценцию как указано в разделе «Материалы и методы». Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего ($n = 5$). *** — $p < 0,001$.

оксидазе, повышает вероятность открытия пор mPTP, что также ведет к усиленной генерации мтАФК. Интересно, что в нейтрофилах пациентов с ХГБ наблюдалась повышенная Ca^{2+} -зависимая продукция липидного медиатора воспаления лейкотриена В₄ [21]. Можно полагать, что избыточный уровень Ca^{2+} и мтАФК определяет как аберрантный НЕТоз, так и другие воспалительные процессы, ведущие к аутоиммунным и воспалительным заболеваниям, от которых часто страдают пациенты с ХГБ.

Таким образом, в нашей работе было впервые показано, что нейтрофилы пациентов с ХГБ не только ограничены в своей возможности бороться

с большим числом патогенов, но также имеют значительные отклонения в кальциевой регуляции и, как следствие, нарушение такого Ca^{2+} -зависимого процесса, как НЕТоз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-00-00088). Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Segal A.W. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease // *Mol. Med. Today*. 1996. Vol. 2. N 3. P. 129–135.
2. Leto T.L. The respiratory burst oxidase // *Inflammation basic principles and clinical correlates* / Eds. J.I. Gallin and R. Snyderman. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. P. 769–787.
3. Scharff O., Foder B. Regulation of cytosolic calcium in blood cells // *Physiol. Rev.* 1993. Vol. 73. N 3. P. 547–582.
4. Mikoshiba K. Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases // *Adv. Biol. Regul.* 2015. Vol. 57. P. 217–227.
5. Clemens R.A., Lowell C.A. CRAC channel regulation of innate immune cells in health and disease // *Cell. Calcium*. 2019. Vol. 78. P. 56–65.
6. Geiszt M., Kapus A., Németh K., Farkas L., Ligeti E. Regulation of capacitative Ca^{2+} influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 42. P. 26471–26478.
7. Geiszt M., Kapus A., Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? // *J. Leukoc. Biol.* 2001. Vol. 69. N 2. P. 191–196.
8. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.
9. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Sci. STKE*. 2007. Vol. 2007. N 379. P. pe11.
10. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // *Cell. Rep.* 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.
11. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmun. Rev.* 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.
12. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 38.
13. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol.* 2007. Vol. 176. N 2. P. 231–241.
14. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.
15. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 9. P. 2817–2822.
16. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro // *Eur. J. Cell. Biol.* 2017. Vol. 96. N 3. P. 254–265.
17. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // *Immunobiology*. 2016. Vol. 221. N 2. P. 208–219.
18. Mahomed A.G., Anderson R. Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with a phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium // *Inflammation*. 2000. Vol. 24. N 6. P. 559–569.
19. Fasolato C., Pozzan T. Effect of membrane potential on divalent cation transport catalyzed by the “Electroneutral” ionophores A23187 and ionomycin // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. N 33. P. 19630–19636.
20. Gupta A.K., Giaglis S., Hasler P., Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A // *PLoS One*. 2014. Vol. 9: e97088.
21. Song Z., Huang G., Chiquetto Paracatu L., Grimes D., Gu J., Luke C.J., Clemens R.A., Dinanier M.C. NADPH oxidase controls pulmonary neutrophil infiltration in the response to fungal cell walls by limiting LTB₄ // *Blood*. 2020. Vol. 135. N 12. P. 891–903.

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

NADPH oxidase modulates Ca^{2+} -dependent formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva^{1,*}, B.V. Chernyak²

¹*Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119992, Russia;*

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

Chronic granulomatous disease (CGD) is a severe inherited immunodeficiency characterized by recurrent bacterial and fungal infections and aberrant inflammation. The CGD phenotype is due to deficiency of phagocytic NADPH oxidase, unable to generate reactive oxygen species (ROS). Such phagocytes are limited in phagocytosis and degranulation as well as a unique means of combating pathogens, neutrophil extracellular traps (NETs) formation, in response to many receptor and pharmacological stimuli. However, activation of NET formation by neutrophils isolated from the blood of CGD patients in response to calcium ionophores was described in our recent study. As was shown previously, neutrophils deficient in NADPH oxidase are not only unable to form ROS, but also have deficiency in the electrogenic activity of the enzyme and membrane depolarization upon activation. Therefore, these neutrophils have impaired extracellular Ca^{2+} influx and, as a result, multiple disorders in the synthesis of pro-inflammatory cytokines. In the present study, we showed that NET formation by CGD neutrophils in response to calcium ionophore A23187 is accompanied by excessive accumulation of intracellular Ca^{2+} . We explain this disorder by the deficiency of the electrogenic function of mutant NADPH oxidase, which in healthy donor neutrophils causes membrane potential depolarization. The results obtained in our study indicate an important function of phagocytic NADPH oxidase as a modulator of Ca^{2+} -dependent signaling pathways, and potentially can be used for treatment of CGD.

Keywords: *human neutrophils, oxidative burst, reactive oxygen species, neutrophil extracellular traps, NETosis, chronic granulomatous disease*

Сведения об авторах

Воробьева Нина Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-46-46. e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Черняк Борис Викторович — докт. биол. наук, проф., зав. лаб. биоэнергетики клетки НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-50; e-mail: bchernyak1@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 595.772

**Морфологические тенденции в морфометрии ног
в семействе Dolichopodidae (Diptera)****М.А. Чурсина^{1,*}, О.П. Негрбов²**

¹Кафедра биологии растений и животных, естественно-географический факультет,
Воронежский государственный педагогический университет, Россия, 394043, г. Воронеж, ул. Ленина, д. 86;

²кафедра экологии и систематики беспозвоночных животных, медико-биологический факультет,
Воронежский государственный университет, Россия, 394018, г. Воронеж, Университетская пл., д. 2
*e-mail: chursina.1988@list.ru

Межвидовая изменчивость морфометрических признаков ног была изучена на 2885 экземплярах, принадлежащих к 65 видам 22 родов семейства Dolichopodidae (Diptera). Были произведены измерения девяти морфометрических признаков ног, в том числе длины передних, средних и задних бедер, голеней и первых члеников лапок, и получены данные о 12 относительных признаках. Дисперсионный анализ позволил выявить значимые различия морфометрических признаков между родами, но не между подсемействами. Большая часть изученных признаков имела слабый филогенетический сигнал. Достоверный филогенетический сигнал был обнаружен только у одного признака из двенадцати изученных — соотношения длины средних бедер и длины средних голеней. В результате анализа главных компонент вариации были выделены типичные для представителей семейства признаки, а также две основные тенденции изменчивости: удлинение первых члеников средних и задних лапок и изменчивость соотношения длин передних, средних и задних бедер. С помощью кластерного анализа были выделены три морфологические группы, различающиеся не только морфологически, но и по типам местообитаний: группа *Medetera* (длина передних, средних и задних бедер практически одинакова), группа *Hydrophorus* (значительно удлинены средние и задние бедра и голени относительно передних), группа *Sciapus* (значительно удлинены членики всех ног). Каждая из выделенных групп включает виды, принадлежащие к разным подсемействам. Поэтому следует предполагать, что сходство признаков морфометрии ног у долихоподид в большей части является следствием конвергентной эволюции, а не наличием общего предка со сходной морфологией.

Ключевые слова: *Diptera*, *Dolichopodidae*, *Hydrophorus*, *Medetera*, *Sciapus*, морфометрия, ноги, филогения, филогенетический сигнал

Значительное межвидовое разнообразие признаков морфометрии крыла, антенн и ног в семействе Dolichopodidae (Diptera) предполагает, что данные признаки особенно подвержены эволюционным изменениям, а также они широко используются в систематике семейства на различных таксономических уровнях. Подробный анализ фенотипической вариации комплекса признаков может помочь в таксономических исследованиях, а понимание направления отбора важно для построения филогенетических схем и изучения эволюционных тенденций.

В настоящее время морфометрия в сочетании с молекулярно-генетическими методами является одним из наиболее перспективных подходов для изучения филогении и эволюционных тенденций [1]. Чаше всего в исследованиях подобного типа используются признаки морфометрии крыла, которые позволяют не только дифференцировать близкородственные виды [2], географические под-

виды [3], разные линии одного вида [4] и даже особей, выращенных в разных условиях [5], но и устанавливают значимую корреляцию подобных признаков с филогенией, построенной на основе молекулярных данных [6, 7]. Причина такого широко изучения формы крыла очевидна: полёт играет важную роль для большинства двукрылых насекомых, поскольку обеспечивает возможность избежать нападения хищника или поймать добычу, найти партнера для размножения; крылья также часто выполняют и другие функции, кроме локомоторной, например, участвуют в процессе половых взаимоотношений — ухаживаний самца за самкой или схваток между самцами [8].

Признакам морфометрии ног уделяется гораздо меньше внимания, хотя их роль в жизни двукрылых также несомненна. Соотношения длин различных сегментов ног используются для диагностики видов долихоподид, например, в родах *Argyra* Macquart, 1834, *Campsicnemus* Haliday, 1851,

Tachytrechus Haliday, 1851 [9]. Разнообразные модификации ног у самцов семейства используются в половом поведении [10, 11]. Кроме того, модификации ног всегда вызывали у исследователей интерес как с точки зрения их таксономического, так и функционального значения. Например, в семействе Empididae, родственном семейству Dolichopodidae, был описан вид, самцы которого не только имеют значительно расширенные передние ноги, но и часто проявляют асимметрию по данному признаку [12]. Такое значительное разнообразие говорит об интенсивном отборе признаков ног, но морфометрические характеристики ног Dolichopodidae на данный момент изучены лишь фрагментарно [13].

В связи с этим целью настоящей работы являлись анализ разнообразия морфометрических признаков ног видов Dolichopodidae и их таксономической значимости, а также оценка их филогенетического сигнала.

Материалы и методы

Объекты исследования. Было изготовлено 2885 препаратов ног 65 видов семейства из 22 родов (таблица). Для исследования были использованы экземпляры, собранные авторами на протяжении 2013–2019 гг., а также экземпляры из коллекции кафедры экологии и систематики беспозвоночных животных Воронежского государственного университета (Воронеж, Россия). Определение производилось по ключам Негрובה и Штакельберга [9]. Поскольку было показано, что в морфометрических признаках ног присутствует половой диморфизм, для изучения были отобраны только самцы.

Изученные признаки. Были измерены девять морфометрических признаков ног: длины переднего, среднего и заднего бедер (F1, F2, F3), передней, средней и задней голени (T1, T2, T3), первого членика передней, средней и задней лапок (tar1, tar2, tar3). Далее были рассчитаны 12 относительных признаков: отношение длин F1 к T1, F1 к tar1, F1 к F2, F1 к F3, T1 к tar1, T1 к T2, T1 к T3, F2 к T2, F2 к tar2, T2 к tar2, F3 к T3, F3 к tar3. Измерения производились по фотографиям препаратов с помощью программы ImageJ (1.53b, National Institutes of Health) [14]. Каждое измерение производилось два раза, после чего вычислялась значимость случайных ошибок измерений путем выявления значимости различий между повторностями в ходе дисперсионного анализа. Было выявлено, что различия статистически не достоверны. В дальнейшем производилось изучение как абсолютных, так и относительных признаков.

Анализ молекулярных данных. Филогенетические взаимоотношения между видами анализировались на основе молекулярных последовательностей митохондриального гена, кодирующего

цитохром-с-оксидазу (COI) (810 признаков), депонированных в GenBank ранее [15, 16]. Филогенетическое дерево было построено методом максимального правдоподобия в программе MEGA X (National Institutes of Health) [17]. Надежность внутренних ветвлений была оценена с помощью бутстрэп-анализа с 1000 реплик.

Статистические методы обработки данных.

Для оценки различий между группами (видами, родами и подсемействами, а также полами, сторонами и повторностями) использовался дисперсионный анализ (MANOVA). Результаты дисперсионного анализа оценивались при помощи апостериорного теста Тьюки. Анализ главных компонент вариации (principal component analysis, PCA) был использован для изучения различий между группами.

Кластерный анализ производился методом присоединения ближайшего соседа, бутстрэп-поддержка производилась на основе 1000 повторностей. Для построения дендрограмм и графика распределения таксонов в пространстве изменчивости морфометрических признаков использовалась программа Past (3.10, Hammer&Harper).

Филогенетический сигнал морфометрических признаков ног был изучен двумя способами. Во-первых, филогенетическое дерево было наложено на пространство форм в программе MorphoJ (2.0, C.P. Klingenberg) [18]. Проверялась нулевая гипотеза о том, что филогенетический сигнал в морфометрических признаках ног отсутствует. Для ее проверки было вычислено Р-значение как доля перестановок, которые с учетом морфометрических признаков приводят к длине дерева, меньшей или равной той, которая наблюдается для филогенетических данных.

Во-вторых, в качестве меры филогенетического сигнала морфометрических признаков ног была использована лямбда Пагеля [19]. Для расчета лямбды Пагеля использовалась функция *phylosig* пакета *phytools* [20] в среде R, для оценки статистической значимости – перестановочный тест с 999 повторностями.

Отдельно следует отметить, как производился анализ данных, полученных методами традиционной морфометрии, с помощью программы MorphoJ (2.0, C.P. Klingenberg) [18], предназначенной для изучения признаков форм. Изучение морфометрии ног средствами геометрической морфометрии изначально было невозможно, поскольку конечности двукрылых не имеют устойчивой формы. Поэтому изначально измерения производились традиционными методами. Затем полученные данные были представлены в виде текстового файла, содержащего координаты *x* и *y*. Так, каждая нога представлялась в виде трех отрезков, расположенных друг за другом, координаты начала первого отрезка соответствовали вершине бедра, длина отрезка была пропорциональна длине бедра экзем-

Изученные виды (число экземпляров каждого вида указано в скобках)

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2020. Т. 75. № 3

пляра, координаты конца отрезка соответствовали вершине бедра и основанию голени. Аналогично были представлены координаты вершины голени, основания первого членика лапки. Данные, полученные методом традиционной морфометрии, в дальнейшем анализировались при помощи программы MorphoJ.

Результаты

Дисперсионный анализ (MANOVA) продемонстрировал наличие значимых различий между родами (лямбда Уилкса = 0,0002, $F = 267$, $df = 228$, 47451,7, $p < 0,0001$). Различия между подсемействами были менее значимы (лямбда Уилкса = 0,0045, $F = 482$, $df = 84$, 28567, $p < 0,01$). Пост-хок тест Тьюки показал, что такие подсемейства, как Dolichopodinae и Sympycninae, Rhabdiinae и Diaphorinae, Sciapodinae и Neurigoninae достоверно не различаются по исследованным признакам.

Также определенные различия присутствовали между видами (лямбда Уилкса = 0,000001, $F = 175$, $df = 744$, 54370, $p < 0,00001$). Поскольку наблюдались значимые различия между самцами и самками (лямбда Уилкса = 0,84, $F = 46,90$, $df = 12$, 4669, $p < 0,05$), далее рассматривались только самцы. Достоверного различия между правой и левой сторонами не наблюдалось (лямбда Уилкса = 0,99, $F = 0,25$, $df = 12$, 4669, $p = 0,48$). Также не было выявлено достоверного различия между повторностями измерений: лямбда Уилкса = 0,99, $F = 0,78$, $df = 12$, 4669, $p = 0,99$.

Анализ главных компонент позволил выделить две переменные, включающие более 80% изменчивости. Первая компонента (PC1) содержала более 60% вариации морфометрических призна-

ков ног и включала в основном изменчивость относительных длин первых члеников средних и задних лапок. Вдоль оси PC1 можно проследить следующую тенденцию: относительная длина tar2 уменьшается в ряду от 1 до 3 (рисунок).

1) у видов *Sciapus*, *Neurigona*, *Liancalus*, *Xanthochlorus* и *Sybistroma crinipes* относительная длина tar2 максимальная и примерно равна длине F2;

2) большинство изученных видов попадают во вторую группу. Так, соотношение длин F2 и tar2 у видов *Medetera* составляет в среднем 1,3; виды *Dolichopus* (кроме *Dolichopus plumipes*) демонстрируют соотношение F2 к tar2, равное 1,7, и выделяются в подсемействе Dolichopodinae по удлинённому tar2.

3) в третью группу входят виды *Poecilobothrus* и *Hydrophorus*, у которых среднее соотношение F2 к tar2 составляет 2,1 и 3,3; наиболее укороченные tar2 представлены у *Campsicnemus scambus* – данное соотношение у них составляет 4,0. Средние голени *C. scambus* сильно модифицированы, а tar2 значительно укорочен.

Вторая тенденция может быть описана второй главной компонентой вариации (PC2), которая включает более 21% от всей изменчивости морфометрических признаков ног. Она описывает вариацию относительной длины первого членика задних лапок. По оси PC2 (рисунок) прослеживается изменение от видов *Medetera* (соотношение F3:tar3 составляет 3,4) до видов *Dolichopus* и *Sciapus* (соотношение F3:tar3 составляет 1,9).

Кластерный анализ методом связывания ближайших соседей по матрице средних морфометрических признаков ног родов подтвердил, что достоверно выделяются два кластера: первый

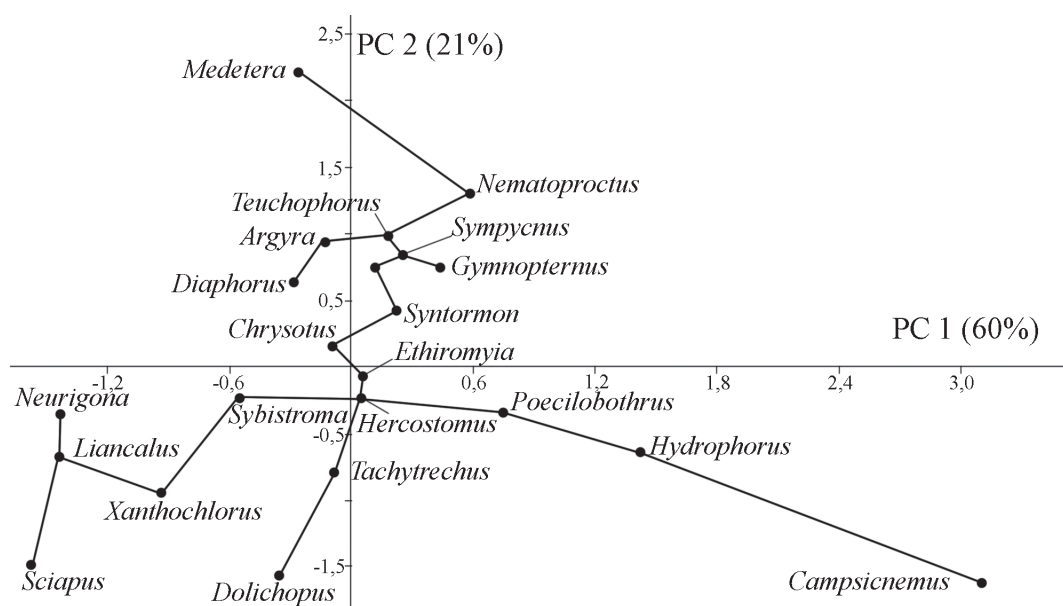


Рисунок. Распределение 22 видов Dolichopodidae в пространстве первой (PC1) и второй (PC2) компонент изменчивости признаков морфометрии ног.

включает виды *Sciapus*, *Neurigona*, *Liancalus* и *Xanthochlorus*; второй — виды *Hydrophorus*, *Campsicnemus* и *Poecilobothrus*. Остальные рассмотренные виды имеют промежуточное состояние признаков.

Наложение филогенетического дерева на пространство изменчивости морфометрических признаков продемонстрировало отсутствие очевидного филогенетического сигнала. Внешние ветви дерева длиннее внутренних. Наиболее сходными по признакам морфометрии ног оказались неблизкородственные виды: *Syntormon* и *Sybistroma*, *Liancalus* и *Neurigona*, *Hydrophorus* и *Tachytrechus*, *Ethiomyia* и *Chrysotus*. p -Значение составляет 0,2981; это означает, что равное по длине или более короткое дерево с учетом морфометрических данных было построено примерно в 70% случаев. Следовательно, достоверного филогенетического сигнала обнаружено не было.

Расчет лямбды Пагеля показал, что достоверный филогенетический сигнал наблюдался только для одного относительного признака из всех изученных признаков, как абсолютных, так и относительных — F2:T2 (лямбда Пагеля составляла 0,99, $p = 0,02$).

Согласно вариации морфометрических признаков ног, изученные виды можно разделить на две группы. Первая выделенная нами группа включает виды *Medetera*, *Rhaphium*, *Argyra*, *Nematoproctus*, *Diaphorus*, *Sympycnus*, которые характеризуются укороченными первыми члениками задних лапок (соотношение F3:tar3 составляет $3,23 \pm 0,05$ — здесь и далее указаны среднее значение и ошибка среднего). В этой группе прослеживаются две особенности. Первая — укороченные средние лапки по сравнению со средними бедрами (соотношение F2:tar2 составляет $1,95 \pm 0,04$). Наиболее ярким примером проявления данного признака являются виды *Nematoproctus*. Вторая — удлинённые средние лапки по сравнению со средними бедрами (соотношение F2:tar2 составляет $1,49 \pm 0,17$), которое представлено у видов *Argyra* и *Medetera*.

Вторая выделенная группа включает виды *Neurigona*, *Sciapus*, *Liancalus*, *Xanthochlorus*, *Tachytrechus*, *Campsicnemus*, *Hydrophorus* — соотношение F3:tar3 у них составляет $2,42 \pm 0,17$, то есть первый членик задних лапок удлинённый по сравнению с задними бедрами. Здесь также можно выделить подгруппы согласно изменчивости относительной длины первого членика средних лапок. Наиболее укороченные первые членики лапок по отношению к средним бедрам (соотношение F2:tar2 составляет $3,50 \pm 0,47$) представлены у видов *Campsicnemus* и *Hydrophorus*. Наиболее удлинённые членики средних лапок по сравнению со средними бедрами (соотношение F2:tar2 составляет $1,06 \pm 0,06$) характерны для видов *Neurigona*, *Sciapus*, *Liancalus*, *Xanthochlorus*.

Обсуждение

Анализ морфометрических признаков ног долихоподид продемонстрировал, в первую очередь, их значительное разнообразие. Отсутствие достоверного филогенетического сигнала у большинства протестированных признаков означает, что в разных подсемействах сходные сочетания признаков возникали независимо друг от друга. Следует предполагать, что сходство признаков морфометрии ног у долихоподид в большей части является следствием конвергентной эволюции, а не наличием общего предка со сходной морфологией.

Основное направление изменчивости морфометрических признаков ног долихоподид касается изменения относительной длины первых члеников задних лапок. Кроме того, важную роль в дифференциации играют соотношения длин передних и задних бедер и голеней. На основе изменчивости изученных признаков были выделены две основные морфологические тенденции. По относительной длине первого членика задних лапок изученные виды были разделены на две группы, и в каждой группе выделены по две сходные тенденции по изменчивости относительной длины первого членика средних лапок.

На основании данной классификации, а также сведений об экологии видов долихоподид можно выделить наиболее типичные для представителей семейства признаки и основные гиатусы, представляющие собой крайние отклонения от условной средней формы.

Условная средняя форма представлена у видов, находящихся у начала координат (рисунок). Она может быть описана следующим образом. Наиболее типичным для долихоподид соотношением длин бедер является F1:F2:F3 — 1:1,3:1,6, а голеней — T1:T2:T3 — 1:1,4:1,9, то есть происходит поступательное увеличение длины бедер и голеней от передних ног к задним. Такое строение в целом характерно для прыгательных задних конечностей. Соотношение бедер и голеней чаще всего приближается к единице, но от передних ног к задним относительная длина голеней возрастает (F1:T1, F2:T2 и F3:T3 составляют в среднем 1:0,99, 1:0,87 и 1:0,81). Относительная длина первого членика лапок на передних и средних ногах одинакова (F1:tar1 и F2:tar2 составляют 1:1,82), тогда как первый членик задних ног обычно укорочен (F3:tar3 составляет 1:2,8). Такая совокупность признаков ног наиболее характерная для видов, занимающих прибрежные биотопы (*Hercostomus*, *Sympycnus*, *Sybistroma*, *Argyra*).

Из видов с укороченными члениками задних лапок наиболее достоверно выделяются виды *Medetera* — у них длина передних, средних и задних бедер практически одинакова (F1:F2:F3 составляет 1:1,05:1,07). Вероятнее всего, эта особенность морфологии ног обуславливает специфическое положение представителей рода

в состоянии покоя — их тело принимает положение не параллельно субстрату, а под углом к нему. Следует отметить, что виды *Medetera* выделяются в семействе тем, что приурочены к лесным местообитаниям, поскольку связаны со стволами деревьев и питаются личинками короедов [20].

Морфологическая форма долихоподид, имеющих длинные членики передних лапок, представлена видами *Xanthochlorus*, *Neurigona* и *Sciapus*, которые выделяются в семействе благодаря тому, что длина первых члеников лапок близка к длине бедер (соотношения F1:tar1, F2:tar2 и F3:tar3 составляют в среднем 1:0,85, 1:1 и 1:0,5). Эти виды, принадлежащие к разным подсемействам, встречаются на опушках и прогалинах леса, на открытых луговых местообитаниях.

Если у *Medetera* средние и задние ноги относительно более короткие, то у *Hydrophorus* — относительно более длинные, и они представляют собой третью морфологическую форму. Они явно выделяются в семействе благодаря значительному различию между длиной передних, средних и задних бедер (соотношение F1:F2:F3 составляет 1:1,8:1,8), передних голеней и средних и задних голеней (соотношение T1:T2:T3 составляет 1:1,9:2,2). Также происходит увеличение соотношений F2/T2 и F3/T3 до единицы и более по сравнению с другими родами, то есть другие долихоподиды обычно обладают средними и задними голенями более длинными, чем средние и за-

дние бедра, тогда как у представителей рода *Hydrophorus* бедра по длине практически равны голеням. По морфометрии ног к видам *Hydrophorus* близки виды *Campsicnemus* и *Poecilobothrus*. Представители данной группы приурочены к водным местообитаниям и держатся на поверхности воды, где охотятся на водных личинок комаров (Smith, Empson, 1955).

Таким образом, на данном этапе исследований следует предполагать, что сходство признаков морфометрии ног у долихоподид в большинстве случаев является следствием конвергентной эволюции, а не наличием общего предка со сходной морфологией, поскольку значимый филогенетический сигнал был выявлен только для одного признака из 21 изученных; по признакам морфометрии ног вместе кластеризуются виды разных подсемейств, приуроченные к сходным местообитаниям. Объяснить наличие значимого филогенетического сигнала для отношения длины средних бедер к длине средних голеней на данном этапе исследований сложно. Для этого требуется дальнейший сравнительный анализ экологии и систематики семейства двукрылых.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Национального фонда естественных наук Китая (проект № 20-54-53005). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев А.Г., Васильева А.И., Шкурихин А.О. Геометрическая морфометрия: от теории к практике. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2018. 471 с.
2. Schutze M.K., Jessup A., Clarke A.R. Wing shape as a potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) // Bull. Entomol. Res. 2012. Vol. 102. N 1. P. 103–111.
3. Tran A.K., Hutchison W.D., Asplen M.K. Morphometric criteria to differentiate *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) // PLoS ONE. 2020. Vol. 15. N 2: e0228780.
4. Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В., Васильев А.Г. Изменчивость формы и размеров крыла в селекционированных по продолжительности жизни линиях *Musca domestica* L.: геометрическая морфометрия // Экол. генетика. 2018. Т. 16. № 1. С. 35–44.
5. Jamillo N., Castillo D., Wolff M.E. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002. Vol. 97. N 5. P. 667–673.
6. Klingenberg C.P., Gidaszewski N.A. Testing and quantifying phylogenetic signals and homoplasy in morphometric data // Syst. Biol. 2010. Vol. 59. N 3. P. 245–261.
7. Pepinelli M., Spironello M., Currie D.C. Geometric morphometrics as a tool for interpreting evolutionary transitions in the black fly wing (Diptera: Simuliidae) // Zool. J. Linnean. Soc. 2013. Vol. 169. N 2. P. 377–388.
8. Land M.F. Chasing and pursuit in the dolichopodid fly *Poecilobothrus nobilitatus* // J. Comp. Physiol. 1993. Vol. 173. N 5. P. 605–613.
9. Негрбов О.П., Штакельберг А.А. Dolichopodidae // Определитель насекомых Европейской части СССР. Т. 5. Ч. 1: Двукрылые, блохи / Под ред. Г.Я. Бей-Биенко. Л.: Наука, 1969. С. 670–752.
10. Sivinski J. Ornaments in the Diptera // Fla. Entomol. 1997. Vol. 80. N 2. P. 142–164.
11. Stubbs A. Courtships of *Dolichopus plumipes* (Scop) (Dolichopodidae) // Dipterists Digest (2nd Series). 1988. Vol. 1. P. 43.
12. Dageron C., Plant A., Winkler I., Stark A., Baylac M. Extreme male leg polymorphic asymmetry in a new empididae dance fly (Diptera: Empididae) // Biol. Lett. 2011. Vol. 7. N 1. P. 11–14.
13. Negrobov O.P., Chursina M.A. Signs of the genus level in the legs morphology of Dolichopodidae (Diptera) // Int. J. Sci. Res. 2013. Vol. 24. N 2. P. 59–64.
14. Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis // Mol. Reprod. Dev. 2015. Vol. 82. N. 7–8. P. 518–529.
15. GenBank. National Center for Biotechnology Information [электронный ресурс]. 2016. Дата обновления: 18.02.2020. URL: [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Дата обращения: 01.05.2020).
16. Bernasconi M.V., Pollet M., Varini-Ooijen M., Ward P.I. Molecular systematic of Dolichopodidae

(Diptera) inferred from COI and 12S rDNA gene sequences based on European exemplars // *Invertebr. Syst.* 2007. Vol. 21. N 5. P. 453–470.

17. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35. N 6. P. 1547–1549.

18. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics // *Mol. Ecol. Resour.* 2011. Vol. 11. N 2. P. 353–357.

19. Pagel M. Inferring the historical patterns of biological evolution // *Nature*. 1999. Vol. 401. N 6756. P. 677–684.

20. Revell L.J. Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things) // *Methods Ecol. Evol.* 2012. Vol. 3. N 2. P. 217–223.

21. Негроров О.П. Малоизвестные виды подсемейства Medeterinae (Diptera, Dolichopodidae) фауны СССР // *Вестн. зоол.* 1971. № 5. С. 43–46.

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 08.06.2020 г.

Принята в печать 25.06.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Morphometric variation in leg segments length in the family Dolichopodidae (Diptera)

M.A. Chursina^{1,*}, O.P. Negrov²

¹Department of Plant and Animal Biology, Natural-Geographical Department, Voronezh State Pedagogical University, ul. Lenin, 86, 394043, Voronezh, Russia;

²Department of Ecology and Systematics of Invertebrate Animals, Medical-Biological Faculty, Voronezh State University, Universitetskaya pl., 2, 394018, Voronezh, Russia

*e-mail: chursina.1988@list.ru

Interspecific variation of legs morphometric characters were investigated on 2885 exemplar species of the family Dolichopodidae of the 65 species belonging to 22 genera. Nine morphometric characters of the leg were measured including lengths of femora, tibia and first segment of tarsi and their ratio were obtained. The results of analysis of variance showed significant differences between the genera, but not between the subfamilies. Most of the studied characters showed weak phylogenetic signal. Significant phylogenetic signal was found in only one of the studied – the ratio of length of middle femora and tibia. Principal component analysis revealed the set of characters most typical for the species of the family, also was demonstrated leg morphometry diversity through two general trends: elongation of the first segment of middle and hind legs and variation in the ratio of fore, middle and hind femora. Cluster analysis allowed us to found three morphologically distinguishable species groups that also differed in terms of their microhabitat: *Medetera*-like species (lengths of fore, middle and hind femora are nearly equal), *Hydrophorus*-like species (middle and hind femora and tibia are significantly extended regarding the fore femora and tibia), *Sciapus*-like species (all first segments of tarsi are significantly extended). Each of the identified groups includes species belonging to different subfamilies. Therefore, the similarity in leg morphometry features in dolichopodids are supported to be related to convergent evolution, and not the presence of a common ancestor with a similar morphology.

Keywords: *Diptera, Dolichopodidae, Hydrophorus, Medetera, Sciapus, morphometry, leg, phylogeny, phylogenetic signal*

Сведения об авторах

Чурсина Мария Александровна — канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биологии растений и животных естественно-географического факультета Воронежского государственного педагогического университета. Тел.: 8-4732-53-29-86; e-mail: chursina.1988@list.ru

Негров Олег Павлович — докт. биол. наук, проф. кафедры экологии и систематики беспозвоночных животных медико-биологического факультета Воронежского государственного университета. Тел.: 8-4732-20-87-96; e-mail: negrov@list.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 599.323.42:591.147.5:591.542(470.2)

Влияние фотопериодических условий Северо-Запада России и экзогенного мелатонина на физиолого-биохимические показатели сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus*)**Е.П. Антонова*, В.А. Илюха, С.Н. Калинина***Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11***e-mail: antonova88ep@mail.ru*

Проведено исследование специфического влияния фотопериодических условий Северо-Западного ФО России (Республика Карелия, г. Петрозаводск) и экзогенного мелатонина на массу тела и физиолого-биохимические показатели крови самцов и самок сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus*). Животные были разделены на 2 группы: контроль (LD: 12 ч свет/12 ч темнота) и опыт (NL: снижение продолжительности световой фазы дня от 19:36/4:24 до 12/12, характерное для Республики Карелия в период с 25.06.18 до 25.09.18). Каждая группа была поделена на 2 подгруппы: хомяки 1-й подгруппы получали питьевую воду без мелатонина (LD, NL), 2-й — на ночь мелатонин (100 мкг/животное) (LD+mel, NL+mel). Наиболее чувствительны к изменению фотопериода оказались самцы, содержание их в NL приводило к увеличению потребления корма, массы тела в середине эксперимента и уровней общего холестерина и мочевины к концу опыта, при этом активности амилазы, лактатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы в крови были ниже по сравнению с LD. Воздействие мелатонина на исследуемые параметры зависело от светового режима и пола животных. Введение гормона самкам в NL способствовало усилению влияния светового режима и росту значений ряда биохимических показателей сыворотки крови относительно контрольных, а также увеличению массы тела на протяжении всего исследования. Применение мелатонина в LD оказало негативное влияние на сирийских хомяков, вызывая интенсификацию обменных процессов и, как следствие, значительное снижение массы тела как у самцов, так и у самок. По нашему мнению, выявленные различия между экспериментальными группами связаны, прежде всего, с изменением синтеза мелатонина пинеальной железой при смене световых условий.

Ключевые слова: млекопитающие, цирканнуальные ритмы, мелатонин, световой режим, метаболизм, биохимические показатели сыворотки крови, потребление пищи

Север — особая климатогеографическая зона, где организм испытывает неблагоприятное воздействие множества факторов. Животные северных регионов подвергаются смене длительных периодов постоянного света в летний сезон («полярный день», сезон «белых ночей») и постоянной темноты зимой («полярная ночь»), тогда как цикл освещения «12 ч свет:12 ч темнота» (LD) наблюдается только в течение нескольких дней во время весеннего и осеннего равноденствия. Реакция организма на изменение световых условий окружающей среды обусловлена функцией нейроэндокринного органа — пинеальной железой (ПЖ), которая отвечает за многочисленные модулирующие влияния на физиологические системы организма в основном посредством своих гормонов, одним из которых является мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин) [1].

Воздействие света на млекопитающих в ночное время рассматривается как один из ведущих экологических факторов, приводящих к нарушению гомеостаза и ускоренному развитию ряда ас-

социированных с возрастом заболеваний [2–5]. Негативное влияние естественного или искусственного освещения ночью связано с ингибирующим действием на уровень пинеального гормона мелатонина в крови [6]. Так, например, содержание лабораторных животных (крысы (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) и домовые мыши (*Mus musculus* L., 1758)) в условиях постоянного освещения (24 ч в сутки) сопровождается возникновением метаболического синдрома, уменьшением продолжительности жизни и увеличением частоты развития пролиферативных процессов и новообразований [2, 3, 7]. Нарушение циркадианных ритмов приводит к разбалансировке физиологических процессов в организме [3, 4, 6] — в частности, у человека десинхроноз может приводить к ожирению, снижению умственной и физической работоспособности, нарушению сна и расстройству пищеварения [5, 8]. Проблема десинхроноза чрезвычайно актуальна для районов Севера, особенно для пришлого населения, поэтому поиск препаратов для коррекции физиологи-

ческого состояния в период смещения сезонных биологических ритмов является перспективным.

К наиболее изученным адаптогенам и потенциальным геропротекторам относится мелатонин, обладающий антиоксидантным, иммуномодулирующим и противоопухолевыми свойствами [7–9]. Мелатонин оптимизирует энергетический баланс и скорость обменных процессов в организме млекопитающих, в том числе человека [5, 10]. Несмотря на множественные положительные эффекты мелатонина у млекопитающих, полученные ранее результаты дают основание полагать, что введение этого гормона на фоне нормального уровня его синтеза может приводить к негативным последствиям [11]. В дополнение к этому, из-за видовых и возрастных особенностей модельных видов, нерешенным остается вопрос о половой специфичности влияния мелатонина на физиологические системы млекопитающих.

Целью настоящего исследования было изучение влияния фотопериодических условий Северо-Запада России (NL: снижение продолжительности световой фазы дня от «19:36 ч свет/4:24 ч темнота» до «12 ч свет/12 ч темнота», характерное для Республики Карелия, г. Петрозаводск в период с 25.06.18 до 25.09.18) и экзогенного мелатонина (100 мкг/животное) на некоторые физиолого-биохимические показатели самок и самцов сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839). Выбор объекта исследования был обусловлен особенностями биологии этого вида. Эволюционное формирование лабораторных грызунов (*M. auratus* и *R. norvegicus*) как видов происходило в световых условиях, значительно отличающихся от таковых на Севере, что делает возможным оценить воздействие «экстремального» фотопериода NL в модельных экспериментах. Так, например, в более ранних исследованиях были получены данные, свидетельствующие о неблагоприятном действии естественного освещения, характерного для Республики Карелия, на показатели гомеостаза и продолжительность жизни лабораторных крыс [2, 7]. Однако в отличие от лабораторных крыс, характеризующихся круглогодичной активностью, сирийский хомяк проявляет сезонность биологических процессов (в осенне-зимнее время наблюдается прирост массы тела, угасание репродуктивной функции, возможна факультативная гибернация) [12]. В связи с вышеизложенным, можно предположить, что влияние экзогенного гормона мелатонина, синхронизирующего сезонные и суточные ритмы, на метаболизм сирийских хомяков будет зависеть от светового режима.

Материалы и методы

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»

с соблюдением международных принципов Директивы Евросоюза 2010/63/EU о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Опыты проводились на самках и самцах сирийского хомяка, полученных из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо» (РФ, Московская область). Все животные содержались в стандартных помещениях вивария Петрозаводского государственного университета (ПетрГУ, г. Петрозаводск) площадью 25 м² в индивидуальных клетках размером 42×26×18,5 см при температуре 23±1°C и влажности в диапазоне от 45% до 55%, в качестве подстилочного материала использовали древесную стружку. Хомяки получали стандартный готовый лабораторный корм (РФ, ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», ГОСТ Р50258-92) и фильтрованную водопроводную воду без ограничений. В возрасте 6,5 мес. животные были разделены на 2 группы и помещены в условия стандартного регулярно чередующегося освещения «12 ч свет/12 ч темнота» (контроль; LD) или освещения, характерного для Республики Карелия, г. Петрозаводск – «19:36 ч свет/4:24 ч темнота» (опыт; NL). После адаптации к световым режимам (14 сут) экспериментальные группы были разделены на подгруппы (в каждой по 4 самца и 4 самки): хомяки 1-й подгруппы получали питьевую воду без мелатонина, 2-й – 5 раз в неделю с питьевой водой в ночное время мелатонин (100 мкг на животное) (LD+mel, NL+mel). При экспериментальном моделировании фотопериодических условий г. Петрозаводска проводилось ежедневное изменение светового режима. Исследование проводили с периода летнего солнцестояния 25 июня (NL, 19:36 ч свет/4:24 ч темнота) до периода осеннего равноденствия – 25 сентября (NL, 12 ч свет/12 ч темнота) (уменьшение световой фазы суточного цикла). К концу эксперимента световые режимы LD и NL полностью соответствовали друг другу как по продолжительности дня, так и по времени начала световой фазы.

Препарат мелатонин (Sigma-Aldrich, США), растворенный в этаноле, добавляли в питьевую воду в концентрации 10 мг/л, конечная концентрация этанола составляла < 0,01% для всех экспериментальных групп. Свежие растворы готовились два раза в неделю: в вечернее время в клетки устанавливались покрытые алюминиевой фольгой поилки (по 10 мл раствора на животное). В среднем хомяки выпивали около 10–15 мл воды в день, при этом 95% от этого общего суточного количества потреблялось в ночное время, таким образом, используемая дозировка мелатонина была приблизительно 100 мкг мелатонина в день на животное.

В ходе эксперимента проводилось определение таких физиологических показателей, как масса тела (еженедельно), кормо- и водопотребление

(ежемесячно) с использованием метаболических клеток для лабораторных животных. Через три месяца эксперимента животных декапитировали и отбирали образцы крови для последующего анализа. Для оценки метаболических изменений у сирийского хомяка проводили определение некоторых биохимических показателей крови на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Chem-7 (Чехия, Erba) с использованием стандартных наборов компании «Вектор-Бест»: уровень глюкозы, холестерина, мочевины — в ммоль/л, креатинина — мкмоль/л, а также активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АсАт), аланинаминотрансферазы (АлАт) и амилазы — в Ед/л. Также в образцах крови спектрофотометрически определяли количество эритроцитов, содержание гемоглобина и общего белка стандартными методиками.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами, используя пакеты программ MS Excel и Statgraphics. Для оценки влияния факторов «световой режим» и «препарат» на изученные показатели применяли многофакторный анализ (MANOVA). Сравнение проводили с применением непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние световых режимов на исследуемые показатели. Своеобразные фотопериодические условия на Севере оказывают значительное влияние на синтез мелатонина ПЖ. Суточная продолжительность секреции ночного мелатонина превращает фотопериодические сигналы в нейроэндокринные изменения, которые модулируют сезонную физиологию млекопитающих [13]. В результате проведенного нами исследования по влиянию фотопериодических условий Северо-Запада России (летне-осенний период, NL) на физиолого-биохимические показатели сирийских хомяков были обнаружены различия приспособительных реакций между самками и самцами. Так, содержание самцов в NL привело к увеличению массы тела (в период с 23.07 по 13.08) и потребления корма по сравнению с самцами в LD-режиме ($p < 0,05$) (рис. 1, 2). У самок световой режим NL оказал значительное влияние только на потребление корма и воды — в конце эксперимента наблюдался рост данных показателей по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 2). Ранее было выявлено, что при перемещении сирийских хомяков из длинного фотопериода (16 ч свет/8 ч темнота) в короткий (8 ч/16 ч) наблюдается рост концентрации мелатонина в крови и значительное увели-

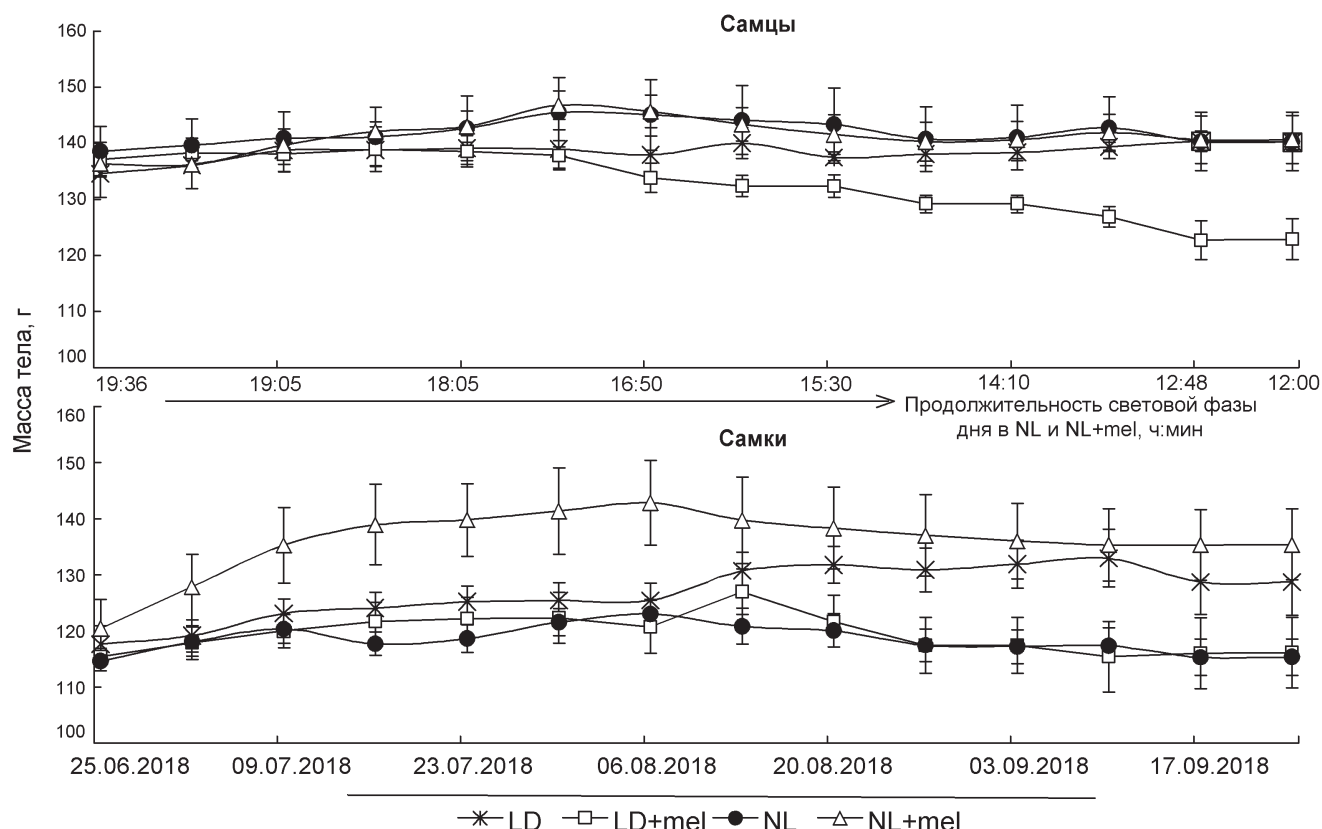


Рис. 1. Изменение веса тела самцов и самок сирийского хомяка в различных экспериментальных группах (в каждой по 4 самца и 4 самки).

Условные обозначения здесь и на рис. 2: LD — стандартное регулярно чередующееся освещение «12 ч свет/12 ч темнота», NL — фотопериодические условия Северо-Запада России (снижение продолжительности световой фазы дня от «19:36 ч свет/4:24 ч темнота» до «12 ч свет/12 ч темнота», характерное для Республики Карелия в период с 25.06.18 до 25.09.18), LD+mel и NL+mel — группы животных, которые получали мелатонин в ночное время.

чение массы жировой ткани [14–16]. Ученые связывают это с тем, что фотопериодические условия влияют на суточную ритмичность секреции гормонов, регулирующих липогенез — кортизола и лептина, при этом концентрация последнего в плазме напрямую зависит от количества адипоцитов [16]. Так, например, средний уровень лептина в крови был выше у сирийских хомяков, подвергнутых короткому фотопериоду (8/16) по сравнению с животными, адаптированными к длинному фотопериоду (16/8) [17]. Необходимо отметить, что немаловажную роль в стимуляции липогенеза играет еще один гормон — инсулин, но

в отличие от крыс и мышей, у сирийских хомяков не обнаружено суточного ритма его секреции в кровь и, как следствие, у глюкозы такой ритм тоже отсутствует [16]. Возможно, именно поэтому мы не выявили влияния светового режима NL на уровень глюкозы в крови как у самок, так и у самцов (табл. 1). Однако у NL-самцов наблюдалось снижение активности ферментов углеводного обмена в сыворотке крови (α -амилаза и ЛДГ) и увеличение содержания общего холестерина по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл. 1).

Содержание сирийских хомяков в NL привело к снижению количества эритроцитов в крови (для

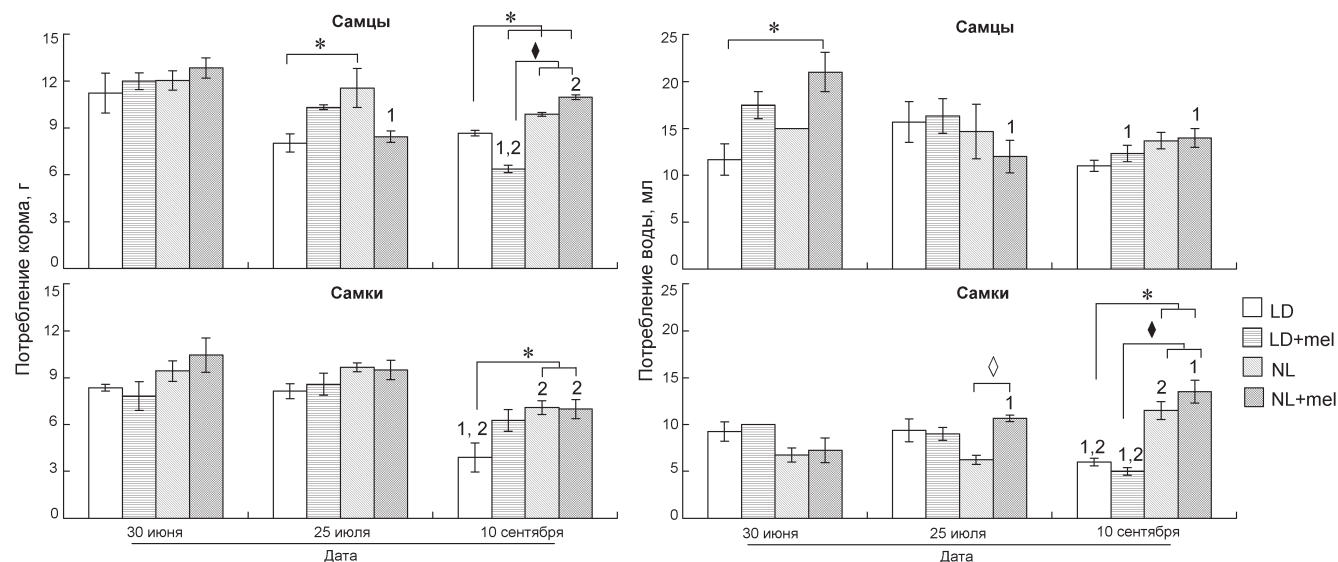


Рис. 2. Потребление корма и воды самцами и самками сирийского хомяка в различных экспериментальных группах (в каждой по 4 самца и 4 самки).

Условные обозначения: 1 — различия достоверны по сравнению с показателями животных в начале эксперимента (25 июня) в аналогичной экспериментальной группе ($p < 0,05$); 2 — различия достоверны по сравнению с показателями животных от 25 июля в аналогичной экспериментальной группе ($p < 0,05$).

* — различия достоверны по сравнению с LD-животными того же возраста ($p < 0,05$); ♦ — различия достоверны по сравнению с LD+mel того же возраста ($p < 0,05$); ◇ — изменения достоверны по сравнению с NL того же возраста ($p < 0,05$).

Таблица 1

Физиолого-биохимические показатели сирийских хомяков (пояснения в тексте)

Показатели	Экспериментальные группы							
	LD		LD+mel		NL		NL+mel	
	♂, n=4	♀, n=4	♂, n=4	♀, n=4	♂, n=4	♀, n=4	♂, n=4	♀, n=4
Масса семенников, г	3,14±0,29	—	2,30±0,45*	—	4,46±0,25*	—	4,35±0,06*	—
Масса печени, г	5,05±0,11	3,99±0,23	3,75±0,28*	3,33±0,11	5,35±0,09	3,99±0,28	4,92±0,22	4,71±0,18*◇
Эритроциты, $10^{12}/л$	6,46±0,15	7,09±0,19	7,11±0,16	6,94±0,06	6,30±0,16	6,48±0,10*	6,32±0,14	6,83±0,16 ◇
Гемоглобин, г%	14,71±0,56	15,18±0,77	15,77±0,45	15,14±0,94	14,52±0,81	14,22±0,46	14,78±0,67	14,53±0,28
Глюкоза, ммоль/л	3,05±0,39	3,50±0,20	2,55±0,13*	3,64±0,4	3,09±0,24	2,76±0,29	2,48±0,10*◇	3,09±0,39
Белок, г/л	57,95±0,88	57,37±3,62	58,24±1,98	60,98±1,27	57,18±2,51	61,13±1,85	56,94±1,76	64,31±2,92*
Холестерин, ммоль/л	1,76±0,08	2,24±0,09	1,72±0,16	2,09±0,18	2,28±0,13*	2,18±0,06	2,14±0,17*	2,48±0,08*
АсАт, Ед./л	367,1±28,9	224,8±45,9	311,5±47,6	425±14,5*	269,5±19,1*	295,5±34,6	276±23,5	394,7±37,1*◇
АлАт, Ед./л	80,44±7,14	55,69±3,58	82,51±4,45	66,01±2,06*	76,32±5,45	77,35±1,87*	76,31±7,43	89,99±6,22*
АсАт/АлАт	4,70±0,35	3,66±0,34	4,56±0,18	6,46±0,43*	3,60±0,49*	3,80±0,37	3,37±0,35*	4,70±0,10*◇
ЛДГ, Ед./л	1541±103	1302±55	1037±75*	1536±234	1147±52*	1468±149	945±161*	1945±246
Амилаза, Ед./л	4753±238	4162±697	4119±388	3398±250	3443±122*	4731±385	3782±354*	5239±385*
Мочевина, ммоль/л	1,38±0,06	1,31±0,09	1,56±0,05*	1,76±0,10*	1,53±0,06*	1,04±0,02*	1,34±0,04 ◇	1,34±0,05 ◇
Креатинин, мкмоль/л	70,75±0,03	82,51±1,47	71,83±2,78	67,77±3,90*	70,72±2,55	82,51±1,47	76,25±4,56	81,03±5,31

Примечание: LD — стандартное регулярно чередующееся освещение «12 ч свет/12 ч темнота», NL — фотопериодические условия Северо-Запада России (снижение продолжительности световой фазы дня от «19:36 ч свет/4:24 ч темнота» до «12 ч свет/12 ч темнота», характерное для Республики Карелия в период с 25.06.18 до 25.09.18), LD+mel и NL+mel — группы животных, которые получали мелатонин в ночное время; ЛДГ — лактатдегидрогеназа, АсАт — аспартатаминотрансфераза, АлАт — аланинаминотрансфераза; * — различия достоверны по сравнению с LD-животными того же пола ($p < 0,05$); ◇ — изменения достоверны по сравнению с NL-животными того же пола ($p < 0,05$).

самок достоверно), играющих ведущую роль в обеспечении тканей кислородом и являющихся чувствительным индикатором состояния организма (табл. 1). При изучении биохимических показателей крови, отражающих уровень белкового обмена, были выявлены половые различия — у самцов в NL-режиме отмечено увеличение содержания мочевины в сыворотке крови; напротив, у самок ее уровень снижался относительно контрольных значений ($p < 0,05$) (табл. 1). Более того, в нашем исследовании выявлены изменения активности аминотрансфераз, которые играют важную роль в обмене аминокислот. Так, при содержании самцов в NL наблюдалось снижение активности АсАт и, как следствие, уменьшение коэффициента де Ритиса (АсАт/АлАт) по сравнению с самцами в LD. Противоположные данные получены на самках — у животных в фотопериодических условиях NL активность как АсАт, так и АлАт в сыворотке крови была выше, чем у LD-самок (табл. 1). Таким образом, в конце эксперимента у самцов сирийского хомяка в фотопериодических условиях Северо-Запада России обнаружено снижение активности некоторых ферментов углеводного и белкового обмена. Учитывая указанные факты и результаты факторного анализа (MANOVA) (табл. 2), можно предположить большую чувствительность самцов сирийского хомяка к изменению фотопериода по сравнению с самками. Возможно, это обусловлено особенностями регуляции репродуктивной функции, которая находится под контролем циркадной системы [14, 15]. Несмотря на значительное уменьшение световой фазы суточного цикла в фотопериодических условиях Северо-Запада России (> 7 ч) размеры семенников у NL-самцов были больше, чем у контрольных животных. Это связано с тем, что для самцов сирийского хомяка критическим фотопериодом, при котором начинается снижение стероидогенеза, является световой режим с продолжительностью дня менее 12 ч [15], однако для полной инволюции гонад необходимо 4 мес. в условиях «8 ч свет/16 ч темнота» [14]. При перемещении самок в подобные условия они продолжают демонстрировать регулярные 4-дневные эстральные циклы в течение 3–6 нед, прежде чем происходит прекращение половой цикличности [18].

Сопоставление результатов, полученных в нашей работе и в исследованиях на других видах млекопитающих, подтверждает наличие видоспецифичности физиологических реакций на изменение фотопериода. Так, например, было показано, что у крыс (самцы и самки), находящихся в условиях NL, наблюдается снижение прироста массы тела, увеличение количества потребляемого корма, а также в крови повышен уровень глюкозы, холестерина, бета-липопротеидов, мочевины и креатинина с одновременным снижением содержания общего белка по сравнению с контрольными животными [2]. Вероятно, это связано с различиями

в сезонной активности между лабораторными видами (крысы, мыши и сирийские хомяки). Для *R. norvegicus* и *M. musculus* характерна круглогодичная активность, при которой в осенне-зимний период может происходить снижение массы тела. Для *M. auratus* в природе характерна факультативная гибернация, которая длится с ноября по март [12]. При этом зверьки могут либо набирать массу тела перед спячкой, либо практически не менять ее в конце лета — начале осени.

Таблица 2

Результаты многофакторного анализа (MANOVA) влияния светового режима и мелатонина на исследуемые показатели сирийских хомяков

Пол	Показатель	Фактор	df	F	P	Сила влияния, η^2 %
Самцы	Вес животного	А	1	9,99	0,002	6,72
	Потребление воды	Б	1	4,31	0,047	6,96
	Потребление корма	А	1	9,69	0,004	11,53
	Вес семенников	А	1	50,43	0,000	42,05
		Б	1	6,95	0,015	24,38
	Вес печени	Б	1	42,07	0,000	80,08
	Уровень холестерина	А	1	9,83	0,012	51,69
	Активность АсАт	А	1	4,41	0,023	37,09
	Активность ЛДГ	А	1	5,60	0,042	20,09
		Б	1	11,85	0,007	42,52
	Активность амилазы	А	1	6,21	0,032	35,13
	Уровень мочевины	АБ	1	12,42	0,007	55,50
Самки	Вес животного	Б	1	4,07	0,045	1,77
	Потребление воды	А	1	5,45	0,025	4,37
		Б	1	5,84	0,021	4,69
	Потребление корма	А	1	17,60	0,0002	17,12
	Количество эритроцитов	А	1	6,73	0,024	29,99
	Вес печени	АБ	1	10,62	0,007	31,71
	Активность АсАт	Б	1	17,16	0,002	61,00
	Активность АлАт	А	1	40,32	0,000	70,68
		Б	1	10,21	0,011	17,89
	Активность амилазы	Б	1	7,02	0,045	7,91
	Уровень креатинина	Б	1	5,50	0,047	26,36
	Уровень мочевины	А	1	21,73	0,002	38,81
		Б	1	25,23	0,001	45,07

Примечание: А — фактор «световой режим Северо-Запада России», Б — фактор «препарат мелатонин»; ЛДГ — лактатдегидрогеназа, АсАт — аспартатаминотрансфераза, АлАт — аланинаминотрансфераза.

Влияние экзогенного мелатонина на исследуемые показатели. В целях коррекции физиологического состояния в период смещения сезонных биологических ритмов сирийским хомякам в ночное время в воду добавляли мелатонин. На сегодняшний день проведено значительное количество исследований по воздействию экзогенного мелатонина на весовые характеристики лабораторных грызунов. Во многих работах на крысах отмечалось влияние мелатонина на энергетический баланс животного, проявляющееся в снижении мас-

сы тела и увеличении расхода энергии за счет двигательной активности [10, 19]. В длительных экспериментах на крысах выявлено связанное с полом специфическое воздействие мелатонина на физиолого-биохимические показатели [2, 7]. Так, применение мелатонина в LD приводило к увеличению массы тела самцов, тогда как у самок, напротив, к снижению. В естественном фотопериоде Республики Карелия (NL) введение экзогенного мелатонина оказало достоверное влияние только на массу самцов, вызывая рост данного показателя [2]. У сирийских хомяков независимо от половой принадлежности применение мелатонина в длинном фотопериоде вызывало увеличение массы тела [14]. В результате проведенного нами исследования установлено, что влияние мелатонина на физиологические показатели сирийских хомяков зависит от светового режима и пола животных — гормон способствовал увеличению веса тела только у самок в NL+mel, противоположное действие мелатонина на данный показатель самцов и самок отмечено в LD+mel (рис. 1). При этом у самцов в режиме LD+mel выявлено снижение потребления корма (рис. 2) и массы семенников к концу эксперимента (табл. 1). Мелатонин модулирует сезонность в репродуктивном статусе, воздействуя на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось. Посредством продукции гипоталамусом гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) осуществляется регуляция суточных ритмов секреции лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов гипофиза, которые, в свою очередь, оказывают влияние на синтез половых стероидных гормонов гонадами [20]. Важную роль в регуляции синтеза и секреции ГнРГ играют гонадотропины, половые стероидные гормоны, инсулин и мелатонин. Инволюция гонад у самцов сирийского хомяка сопровождается значительным снижением сывороточных уровней ФСГ, ЛГ, а также концентрации тестостерона и его метаболитов в гонадах [15].

Введение экзогенного мелатонина (NL+mel и LD+mel) вызывало у самцов повышение, а у самок сирийского хомяка — снижение уровня глюкозы в сыворотке крови по сравнению с LD (табл. 1, 2). Помимо этого, у самок в NL+mel обнаружены более высокие активности амилазы и ЛДГ в сыворотке крови относительно контрольных значений. Более ранние исследования показали, что удаление ПЖ у сирийских хомяков значительно изменяет уровень глюкозы в крови и ее использование в разных тканях [16]. Мелатонин, действуя через связанные с MT1- и MT2-рецепторами сигнальные пути, регулирует функцию поджелудочной железы, влияя на биосинтез как глюкагона, так и инсулина. Возможно, обнаруженные нами у хомяков (самцы и самки) в режиме NL+mel более высокие уровни активности α -амилазы (табл. 1) связаны с регуляторной функцией этого гормона в желудочно-кишечном тракте. Ранее

установлено, что мелатонин предотвращает развитие острого панкреатита и защищает поджелудочную железу от негативного воздействия различных факторов [21]. Применение мелатонина вызывало дозозависимое увеличение активности α -амилазы в сыворотке крови крыс [22], а нарушение суточной цикличности синтеза мелатонина способствовало развитию острого панкреатита [21]. Механизм такого действия заключается в активации энтеропанкреатического рефлекса и повышении секреции холецистокинина [21, 22].

Еще одним органом-мишенью для мелатонина является печень, отвечающая за многочисленные пищеварительные и экскреторные функции, а также отвечающая за взаимосвязь углеводного, жирового и белкового обменов. Нарушение суточного ритма синтеза мелатонина способно провоцировать увеличение продукции активных форм кислорода и приводить к повреждению клеток печени [23]. В нашем исследовании введение мелатонина в LD-режиме независимо от пола животного приводило к снижению массы печени (табл. 1). Противоположные изменения наблюдались у самок в NL+mel (увеличение печени и уровня холестерина) по сравнению с LD, что схоже с влиянием светового режима NL на самцов сирийского хомяка (рис. 1, табл. 1, 2). Помимо этого, экзогенный мелатонин вызывал достоверное увеличение активности как АсАт, так и АлАт в сыворотке крови у самок в режимах LD+mel и NL+mel, что может указывать на интенсификацию метаболических процессов. Подтверждением этого служит рост уровня мочевины в сыворотке крови самок из групп LD+mel и NL+mel по сравнению с данными показателями самок из режимов LD и NL соответственно (табл. 1). Кроме того, введение мелатонина самкам в NL-режиме вызвало повышение уровня эритроцитов до контрольных значений.

В экспериментах на крысах применение мелатонина как в LD-, так и NL-режимах независимо от пола животных приводило к значительному изменению ряда биохимических показателей в сыворотке крови: снижению уровня глюкозы, холестерина, мочевины и креатинина, а также увеличению содержания общего белка [2, 7]. Возможно, это обусловлено различиями ночных ритмов синтеза мелатонина, связанными с суточной активностью у млекопитающих [24]. У сирийских хомяков начало ночи не связано с немедленным ростом секреции мелатонина — первые несколько часов сопровождаются низким уровнем гормона в крови. После этого интенсивность синтеза мелатонина быстро растет, достигает короткого пика и снижается в конце ночи. Для сирийских хомяков показана как бимодальная активность в природе, так и ночная активность в лаборатории [25]. У крыс и домашних мышей, активных в вечернее время, секреция гормона в кровь значительно возрастает вскоре после наступления темноты. Зна-

чения продолжают постепенно увеличиваться и достигают пика около середины темной фазы, затем уровень мелатонина начинает падать [23].

В результате проведенного исследования с использованием многофакторного анализа выявлено, что самцы сирийского хомяка более чувствительны к влиянию фотопериодических условий Северо-Запада России по сравнению с самками. Так, у самцов в NL-условиях наблюдалось увеличение массы тела в середине эксперимента, рост уровней общего холестерина и мочевины в конце опыта, а также снижение активностей ферментов (ЛДГ, амилазы и АсАт) в сыворотке крови по сравнению с контрольными животными. Применение мелатонина в период сокращения светового дня подтвердило участие этого гормона в регуляции метаболических процессов у сирийских хомяков. Действие гормона на самок в NL+mel частично усиливало воздействие светового режима NL, способствуя увеличению массы тела, уровней холестерина и мочевины, а также активностей амилазы, ЛДГ и аминотрансфераз в крови. Введение мелатонина в стандартном режиме освещения привело к снижению массы тела и исследованных

органов у самцов и самок. При этом у последних отмечено максимальное среди всех экспериментальных групп увеличение активности аминотрансфераз и уровня мочевины в сыворотке крови. Таким образом, введение этого гормона на фоне нормального уровня его синтеза вызвало значительную интенсификацию обменных процессов у сирийского хомяка, что в совокупности с низким потреблением корма может повлечь за собой ряд негативных последствий для организма.

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН за помощь в проведении эксперимента.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0073).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Этической комиссией Института биологии КарНЦ РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects // J. Biol. Rhythms. 2005. Vol. 20. N 4. P. 291–303.
2. Анисимов В.Н., Виноградова И.А., Букалев А.В., Попович И.Г., Забежский М.А., Панченко А.В., Тындык М.Л., Юрова М.Н. Световой десинхроноз и риск злокачественных новообразований у лабораторных животных: состояние проблемы // Вопр. онкол. 2014. Т. 60. № 2. С. 15–27.
3. Madahi P. G., Ivan O., Adriana B., Diana O., Carolina E. Constant light during lactation programs circadian and metabolic systems // Chronobiol. Int. 2018. Vol. 35. N 8. P. 1153–1167.
4. Nelson R.J., Chbeir S. Dark matters: Effects of light at night on metabolism // Proc. Nutr. Soc. 2018. Vol. 77. N 3. P. 223–229.
5. Moreno J.P., Crowley S.J., Alfano C.A., Thompson D. Physiological mechanisms underlying children's circannual growth patterns and their contributions to the obesity epidemic in elementary school age children // Obes. Rev. 2020. Vol. 21. N 3: e12973.
6. Touitou Y., Reinberg A., Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption // Life Sci. 2017. Vol. 173. P. 94–106.
7. Vinogradova I., Anisimov V. Melatonin prevents the development of the metabolic syndrome in male rats exposed to different light/dark regimens // Biogerontology. 2013. Vol. 14. N 4. P. 401–409.
8. Панопорт С.И. Хрономедицина, циркадианные ритмы. Кому это нужно? // Клин. мед. 2012. Т. 90. № 8. С. 73–75.
9. Ding A.J., Zheng S.Q., Huang X.B., Xing T.K., Wu G.S., Sun H.Y., Qi S.H., Luo H.R. Current perspective in the discovery of anti-aging agents from natural products // Nat. Prod. Bioprospect. 2017. Vol. 7. N 5. P. 335–404.
10. Cipolla-Neto J., Amaral F.G., Afeche S.C., Tan D.X., Reiter R.J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review // J. Pineal Res. 2014. Vol. 56. N 4. P. 371–381.
11. Andersen L.P., Gögenur I., Rosenberg J., Reiter R.J. The safety of melatonin in humans // Clin. Drug Investig. 2016. Vol. 36. N 3. P. 169–175.
12. Chayama Y., Ando L., Tamura Y., Miura M., Yamaguchi Y. Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator // R. Soc. Open Sci. 2016. Vol. 3. N 4: 160002.
13. Pévet P., Challet E. Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network // J. Physiol. Paris. 2011. Vol. 105. N 4–6. P. 170–182.
14. Bartness T.J., Wade G.N. Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters // Neurosci. Biobehav. Rev. 1985. Vol. 9. N 4. P. 599–612.
15. Mukherjee A., Halder C. Photoperiodic regulation of melatonin membrane receptor (MT1R) expression and steroidogenesis in testis of adult golden hamster, *Mesocricetus auratus* // J. Photochem. Photobiol. B. 2014. Vol. 140. P. 374–380.
16. Chakir I., Dumont S., Pévet P., Ouarour A., Challet E., Vuillez P. Pineal melatonin is a circadian time-giver for leptin rhythm in Syrian hamsters // Front. Neurosci. 2015. Vol. 9: 190.
17. Horton T.H., Buxton O.M., Losee-Olson S., Turek F.W. Twenty-four-hour profiles of serum leptin in siberian and golden hamsters: photoperiodic and diurnal variations // Horm. Behav. 2000. Vol. 37. N 4. P. 388–398.
18. Tamarkin L., Westrom W.K., Hamill A.I., Goldman B.D. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin // Endocrinology. 1976. Vol. 99. N 6. P. 1534–1541.
19. Terrón M.P., Delgado-Adámez J., Pariente J.A., Barriga C., Paredes S.D., Rodríguez A.B. Melatonin reduces

body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats // *Physiol. Behav.* 2013. Vol. 118. P. 8–13.

20. Шнаков А.О., Деркач К.В. Гонадолиберин – синтез, секреция, молекулярные механизмы и мишени действия // *Acta Biomedica Scientifica*. 2019. Т. 4. № 2. С. 7–15.

21. Jaworek J., Szklarczyk J., Jaworek A.K., Nawrot-Porąbka K., Leja-Szpak A., Bonior J., Kot M. Protective effect of melatonin on acute pancreatitis // *Int. J. Inflamm.* 2012. Vol. 2012: 173675.

22. Jaworek J., Leja-Szpak A., Nawrot-Porąbka K., Szklarczyk J., Kot M., Pierzchalski P., Górska M., Ceranowicz P., Warzecha Z., Dembinski A., Bonior J. Effects of melatonin and its analogues on pancreatic inflammation, enzyme secretion, and tumorigenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 5: 1014.

23. Zhang J.J., Meng X., Li Y., Zhou Y., Xu D.P., Li S., Li H.B. Effects of melatonin on liver injuries and diseases // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 4: 973.

24. Reiter R.J. The melatonin message: Duration versus coincidence hypotheses // *Life Sci.* 1987. Vol. 40. N 22. P. 2119–2131.

25. Larimer S.C., Fritzsche P., Song Z., Johnston J., Neumann K., Gattermann R., McPhee M.E., Johnston R.E. Foraging behavior of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) in the wild // *J. Ethol.* 2011. Vol. 29. N 2. P. 275–283.

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.

После доработки 20.06.2020 г.

Принята в печать 07.07.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of photoperiodic conditions of the North-West Russia and exogenous melatonin on physiological and biochemical parameters in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)

E.P. Antonova*, V.A. Ilyukha, S.N. Kalinina

*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
11 Pushkinskaya Street, Petrozavodsk, Karelia, 185910, Russia*

*e-mail: antonova88ep@mail.ru

We studied the effect of the photoperiodic conditions of the North-West Russia (Republic of Karelia, Petrozavodsk) and exogenous melatonin on the body weight and the physiological and biochemical parameters of blood serum in males and females of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). The animals were divided into 2 groups: control (LD: 12 hours light/12 hours darkness) and experiment (NL: decrease in the duration of the daylight phase from 19:36/4:24 to 12/12, that is typical for the Republic of Karelia from June, 25 to September, 25). Each group was divided into 2 subgroups: hamsters of the 1st subgroup received drinking water without melatonin (LD, NL), and the 2nd group received melatonin (100 µg/animal) (LD + mel, NL + mel) at night. Males were more sensitive to the change in the photoperiod than females: their keeping in NL led to an increase in feed intake, body weight in the middle of the experiment, and total cholesterol and urea levels by the end of the experiment, while the activity of amylase, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase in the blood was lower compared to LD. It was established that the effect of melatonin on the studied parameters depended on the light regime and sex of the animals. Melatonin treatment the NL-females caused the enhancement of the effect of the light regime and the increase in the most of biochemical parameters of blood serum compared to the control, as well as the increase in body weight for the entire study period. The use of melatonin in the standard lighting conditions had a negative effect on the Syrian hamsters, causing intensification of metabolic processes and, as a result, a significant decrease in body weight in both males and females. In our opinion, the revealed differences between the experimental groups are primarily associated with a change in the synthesis of melatonin by the pineal gland in various light conditions.

Keywords: *mammals, circannual rhythms, melatonin, light mode, metabolism, serum biochemical parameters, food intake*

Сведения об авторах

Антонова Екатерина Петровна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: antonova88ep@mail.ru

Илюха Виктор Александрович — докт. биол. наук, директор Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

Калинина Светлана Николаевна — канд. биол. наук, зав. лабораторией экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: cvetnick@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 633.14:631.523.11:577.175.132

Молекулярный анализ генов сигнального пути гиббереллинов у ржи посевной (*Secale cereale* L.)**М.С. Баженов¹, А.Г. Черноок¹, М.Г. Дивашук^{1,2,*}**

¹Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42;

²Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

*e-mail: divashuk@gmail.com

Гены сигнального пути гиббереллинов, кодирующие DELLA-белок и рецептор гиббереллинов *GID1*, были секвенированы у нескольких сортов (Альфа, Валдай, Орловская 9, Прача) и одной линии ржи (ЕМ-1) с применением методов нового поколения. Выявленные в результате несколько аллелей этих генов различаются преимущественно однонуклеотидными полиморфизмами, реже — инсерциями и делециями. Большая часть обнаруженных мутаций оказались синонимичными либо приходящимися на некодирующие регионы генов. Изменения в аминокислотной последовательности белков, связанные с прочими мутациями, вероятно, являются функционально-нейтральными. Мутации, аналогичные пшеничным аллелям гиббереллин-нечувствительной короткостебельности, обнаружены не были.

Ключевые слова: *Secale cereale*, рожь, гиббереллины, короткостебельность, гены, *DELLA*, секвенирование

Рожь — хлебная зерновая и кормовая сельскохозяйственная культура, широко возделываемая на севере Европы и дающая хорошие урожаи зерна даже на бедных песчаных почвах [1]. Одной из проблем выращивания ржи является ее высокорослость, которая может приводить к полеганию посевов и частичной потере урожая. Основным способом борьбы с полеганием является создание короткостебельных сортов, обладающих прочной соломиной.

Гиббереллины — растительные гормоны, регулирующие рост стеблей и листьев за счет деления и растяжения клеток, а также такие этапы развития, как покой семян и почек, переход к цветению, созревание пыльцы [2]. В 60-е гг. XX в. использование в селекции пшеницы мутантных аллелей генов, обуславливающих нечувствительность роста растений к гиббереллинам, позволило создавать короткостебельные, устойчивые к полеганию, высокоурожайные сорта, пригодные для выращивания при орошении и внесении высоких доз удобрений, что впоследствии было названо «зеленой революцией» в сельском хозяйстве [3]. Гены, обуславливающие гиббереллин-нечувствительную короткостебельность пшеницы, локализованные на хромосомах 4В и 4D, были обозначены как *Rht1* (*Reduced height 1*) и *Rht2* (впоследствии — *Rht-B1b* и *Rht-D1b*) [4]. Также у этой зерновой культуры известно большое число других генов короткостебельности, не связанных с чувствительностью

к гиббереллинам, однако многие из них заметно снижают продуктивность растений и поэтому не используются в создании сортов.

С молекулярно-биологической точки зрения механизм гиббереллин-нечувствительной короткостебельности пшеницы, обусловленной генами *Rht-1*, представляется следующим: ген *Rht-1* кодирует белок DELLA, который связывается с транскрипционными факторами, играя роль коактиватора или корепрессора, и подавляет рост клеток [5, 6]. В норме, в присутствии активных форм гиббереллинов, белок DELLA связывается с белком-рецептором гиббереллинов — *GID1* (*Gibberellin-Insensitive Dwarf 1*), а затем подвергается убиквитинированию и протеасомной деградации. Отсутствие белков DELLA приводит к активизации ростовых процессов. Белки DELLA содержат в себе два основных домена — N-концевой домен, участвующий во взаимодействии с *GID1* и содержащий консервативные аминокислотные мотивы DELLA и VHYNP, а также домен GRAS, обладающий трансактивационной, репрессивной и регуляторной активностью [7, 8]. Структура белка *GID1* сходна со структурой белков семейства гормон-чувствительных липаз и имеет альфа-бета-гидролазную укладку полипептидной цепи. Наиболее значимыми для функционирования *GID1* являются аминокислотные остатки, формирующие субстрат-связывающий центр белка [8]. Мутации *Rht-B1b* и *Rht-D1b* приводят к появлению

белков DELLA, не способных связываться с белком GID1, но сохраняющих функцию репрессора сигнала гиббереллинов [9]. Таким образом, снижение высоты растения, связанное с нарушением сигнального пути гиббереллинов, возможно как за счет повышения стабильности белков DELLA, так и за счет потери функции GID1.

Использование короткостебельных мутантов в селекции ржи началось несколько позже. Ген доминантной гиббереллин-чувствительной короткостебельности *Hl* (*Humilis*), позднее названный *Ddw1* (*Dominant dwarf 1*), был впервые изучен В.Д. Кобылянским в 1972 г. у естественного мутанта ржи ЕМ-1. Этот ген, локализованный на хромосоме 5R, является наиболее широко используемым в современных сортах [10]. Недавние исследования показали, что ген *Ddw1* связан с повышенной активностью фермента гиббереллин-2-оксидазы, участвующего в деградации активных форм гиббереллинов [11]. Помимо 4 доминантных генов *Ddw1* – *Ddw4* [12] у ржи известен ряд рецессивных генов *dw1* – *dw9* [13], а также гены «compactum» – *ct1* и *ct2*. К гиббереллин-нечувствительным у ржи относятся гены *ct1*, *ct2*, *dw6* (аллель *ct2*) [10] и *dw9* [13], однако вопрос об их гомологии с пшеничными генами *Rht-1* или другими известными генами сигнального пути гиббереллинов остается открытым.

Несмотря на очевидность необходимости изучения аллельного разнообразия генов сигнального пути гиббереллинов ржи, гомологичных пшеничным генам *Rht-1* и *Gid1*, подобные исследования еще не проводились. Целью нашей работы стало проведение такого исследования.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве материала для секвенирования были выбраны короткостебельные сорта и линии ржи – сорт Альфа (рецессивно-полигенная короткостебельность), Валдай (рецессивно-полигенная короткостебельность), Орловская 9 (ген *Ddw2*), Прача (ген *Ddw1*), линия ЕМ-1 (*Ddw1*). Семена сортов Альфа и Валдай были предоставлены кафедрой генетики, селекции и семеноводства РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, семена сортов Орловская 9 и Прача – Всероссийским институтом генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, линия ЕМ-1 – Национальной коллекцией мелкосемянных зерновых культур США (National Small Grains Collection).

Выделение ДНК и ПЦР. ДНК выделяли традиционным методом с использованием бромидом цетилтриметиламмония из высушенных листьев [14]. Для выделения ДНК, ПЦР и секвенирования использовались по два индивидуальных растения от каждого образца ржи (двукратная биологическая повторность).

Праймеры для ПЦР были подобраны и использованы ресурса Primer-BLAST NCBI и син-

тезированы в ООО «Синтол». Для амплификации гена, гомологичного пшеничному гену *Rht1*, у ржи использовались праймеры ScRht1-F: 5'-CGAGGCCAGCAAAAGCTTG-3', ScRht1-R: 5'-GGGGTTGTGTTGTCCTCCAT-3'; для гена ржаного гена *Gid1* – праймеры ScGid1-F: 5'-CATCCAAGACCGTCCAAAACAAT-3', ScGid1-R: 5'-GGCAAACACATGGATGGATACAG-3'. Для подбора праймеров использовались последовательности контигов генома ржи Lo7, найденные с помощью алгоритма BLAST на основе последовательностей генов *Rht-1* и *Gid1* пшеницы [15, 16].

ПЦР-смесь состояла из следующих компонентов (даны концентрации компонентов в конечной смеси): 1 × LR Plus буфер pH 9,3 (ООО «Силекс»), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP, 2 мкМ каждого праймера, 0,04 ед./мкл LR Plus-полимеразы, 0,02 ед./мкл Taq-полимеразы, 4 нг/мкл матричной ДНК. Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводилась при следующих температурных условиях: 94°C – 5 мин; 36 циклов 94°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 2 мин; 72°C – 5 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировали методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с буфером TBE с добавлением бромистого этидия. Визуализация электрофореграмм проводилась в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования [17].

Секвенирование и обработка данных. ПЦР-продукты, после проверки их качества с помощью электрофореза, были секвенированы с использованием метода NGS. Секвенирование на платформе MiSeq Illumina было проведено в ООО «Геномед». ДНК-библиотеки были подготовлены с помощью набора реактивов Swift 2S™ Turbo DNA Library Kits (Swift Biosciences, США). В процессе подготовки ДНК-библиотеки ПЦР-продукты, полученные от разных образцов ржи, метили индивидуальными баркодами. После разделения прочтений по баркодам результаты секвенирования были получены по каждому образцу в отдельности [17].

Для сборки полной последовательности гена из коротких прочтений нами была собрана цепочка программ, действующая по принципу сборки *de novo* с использованием референса [18]: SPAdes 3.14.0 – для сборки контигов [19]; CAP3 – для выбора контигов, соответствующих референсу, и их сборки в суперконтиги [20]; SNAP (Scalable Nucleotide Alignment Program) v1.0 [21], freebayes [22], samtools 1.10, bcftools 1.10.2 [23] – для картирования прочтений на суперконтиги, исправления неточностей сборки, выявления аллельных вариантов на случай гетерозиготности растения.

Полученные последовательности генов различных образцов ржи были выравнены с помощью GeneDoc v2.7 [24]. Границы белок-кодирующей последовательности были установлены путем выравнивания на соответствующие последова-

тельности генов-гомологов у пшеницы мягкой. Трансляция в аминокислотную последовательность также выполнена в GeneDoc. Предсказание функциональной значимости аминокислотных замен выполнено с помощью онлайн-сервиса PROVEAN [25]. Положение доменов белков предсказано с помощью поиска консервативных доменов NCBI [26].

Результаты и обсуждение

Секвенирование ПЦР-продуктов (ожидаемый размер 1968 и 2576 п. о. для генов *ScRht1* и *ScGid1* соответственно), включающих полные последовательности генов, с применением методов нового поколения позволило выявить полиморфизмы не только при сравнении сортов и отдельных растений, но и при сравнении аллельных вариантов в пределах одного гетерозиготного растения. Это особенно актуально для ржи, которая является перекрестноопыляемой сельскохозяйственной культурой. Суммарно нами было выявлено 47 полиморфизмов в гене *ScRht1* и 49 в гене *ScGid1* (рисунок, А).

Мы выявили 9 аллелей гена-гомолога *Rht1* (*Della*), различающихся преимущественно однонуклеотидными полиморфизмами. Делеция, обнаруженная в одном из аллелей гетерозиготного растения сорта ржи Альфа, приводит к потере двух остатков глицина в позициях 15 и 16 в полиглициновом районе вблизи N-конца белка (рисунок, Б). У сорта Прача в одном из аллелей гетерозиготного растения была обнаружена аминокислотная замена V368I, приходящаяся на GRAS-домен белка. Большая же часть обнаруженных нами полиморфизмов представляла собой синонимичные замены. Все описанные здесь изменения аминокислотной последовательности белка с большой

вероятностью являются функционально нейтральными по результатам анализа с помощью алгоритма PROVEAN [25].

Ген *Gid1* был секвенирован аналогичным способом у тех же сортов и линий ржи. Обнаруженные в результате секвенирования многочисленные полиморфизмы, включая инсерции и делеции, приходятся в основном на единственный интрон или на промотор гена. Всего было обнаружено 9 аллельных вариантов. Кодировочная часть гена содержит только однонуклеотидные мутации, большая часть которых не приводит к изменению аминокислотной последовательности белка. Несинонимичные мутации были обнаружены только в гетерозиготном состоянии у сорта Прача (M49I) и линии EM1 (R181Q) (рисунок, Б). Данные аминокислотные замены, скорее всего, являются функционально-нейтральными (PROVEAN score $-0,543...+0,380$).

Таким образом, нам удалось выявить достаточно большое число аллелей генов сигнального пути гиббереллинов у ржи. Многие мутации находились в гетерозиготном состоянии, что отражает перекрестный характер опыления этой сельскохозяйственной культуры вместе с внутрисортным разнообразием. Однако большая часть найденных полиморфизмов оказалась «молчащими мутациями», что является проявлением функциональности генов и их значимости для роста и развития растений вместе с давлением естественного и искусственного отборов, «выбраковывающих» нежелательные мутации. Для каждого из генов нами было выявлено лишь по 3 изоформы белков, различающихся аминокислотной последовательностью. Однако у ржи не было выявлено достаточно масштабных изменений, которые могли бы привести к нарушению функции этих белков, или аналогич-

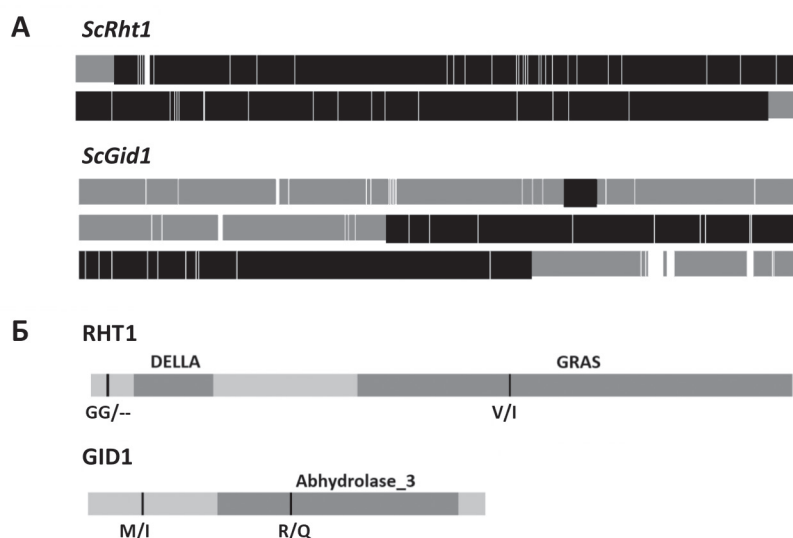


Рисунок. А. Сжатое выравнивание секвенированных последовательностей генов *ScRht1* и *ScGid1*. Белые вертикальные полосы отражают положения полиморфизмов. Черным цветом выделены экзоны генов. **Б.** Места предсказуемых аминокислотных замен в белках DELLA (RHT1) и GID1 ржи (показаны черными полосками). Темно-серым цветом выделены консервативные домены белков.

ных тем, что имеются у гиббереллин-нечувствительных короткостебельных мутантов пшеницы.

Несмотря на довольно большой успех использования гиббереллин-нечувствительных мутаций у пшеницы, среди сортов ржи такой тип короткостебельности распространен мало, что частично подтверждается и результатами нашего исследования. В связи с этим можно предположить, что такие мутации у ржи оказывают существенное негативное плейотропное действие на продуктивность растений либо, в связи с относительно меньшей изученностью культуры, просто еще не были обнаружены.

Мы благодарны д.б.н. И.Г. Лоскутову — заведующему отделом генетических ресурсов овса,

ржи и ячменя Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, д.б.н. В.Д. Кобылянскому — почетному профессору Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, а также д.б.н. В.С. Рубец — профессору кафедры генетики, селекции и семеноводства РГАУ—МСХА имени К.А. Тимирязева за предоставленный растительный материал.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-76-20023). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schlegel R.H.J. Rye: genetics, breeding, and cultivation. CRC Press, 2013. 382 pp.
2. Davière J.-M., Achard P. Gibberellin signaling in plants // *Development*. 2013. Vol. 140. N 6. P. 1147–1151.
3. Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flinham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators // *Nature*. 1999. Vol. 400. N 6741. P. 256–261.
4. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat // *Plant Physiol*. 2011. Vol. 157. N 4. P. 1820–1831.
5. Yoshida H., Hirano K., Sato T., Mitsuda N., Nomoto M., Maeo K., Koketsu E., Mitani R., Kawamura M., Ishiguro S., Tada Y., Ohme-Takagi M., Matsuoka M., Ueguchi-Tanaka M. DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111. N 21. P. 7861–7866.
6. Li S., Tian Y., Wu K., Ye Y., Yu J., Zhang J., Liu Q., Hu M., Li H., Tong Y., Harberd N.P., Fu X. Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture // *Nature*. 2018. Vol. 560. N 7720. P. 595–600.
7. Hirsch S., Oldroyd G.E. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development // *Plant Signal Behav.* 2009. Vol. 4. N 8. P. 698–700.
8. Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Katoh E., Ohmiya H., Asano K., Saji S., Hongyu X., Ashikari M., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin // *Plant Cell*. 2007. Vol. 19. N 7. P. 2140–2155.
9. Fu X., Richards D.E., Ait-Ali T., Hynes L.W., Ougham H., Peng J., Harberd N.P. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor // *Plant Cell*. 2002. Vol. 14. N 12. P. 3191–3200.
10. Börner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A.J. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye // *Euphytica*. 1996. Vol. 89. N 1. P. 69–75.
11. Braun E.-M., Tsvetkova N., Rotter B., Siekmann D., Schwefel K., Krezdorn N., Plieske J., Winter P., Melz G., Voylokov A.V., Hackauf B. Gene expression profiling and fine mapping identifies a gibberellin 2-oxidase gene co-segregating with the dominant dwarfing gene *Ddw1* in rye (*Secale cereale* L.) // *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10: 857.
12. Kantarek Z., Masojć P., Bienias A., Milczarski P. Identification of a novel, dominant dwarfing gene (*Ddw4*) and its effect on morphological traits of rye // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13. N 6: e0199335.
13. Grądzielewska A., Milczarski P., Molik K., Pawłowska E. Identification and mapping of a new recessive dwarfing gene *dw9* on the 6RL rye chromosome and its phenotypic effects // *PLOS ONE*. 2020. Vol. 15. N 3: e0229564.
14. Doyle P.J. DNA protocols for plants // *Molecular techniques in taxonomy* / Eds. G.M.Hewitt, A.W.B. Johnston, and J.P.W. Young. Berlin–Heidelberg: Springer, 1991. P. 283–293.
15. Bauer E., Schmutzer T., Barilar I., et al. Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.) // *Plant J.* 2017. Vol. 89. N 5. P. 853–869.
16. IPK Rye blast server [Electronic resource]. URL: <https://webblast.ipk-gatersleben.de/ryeselect/> (accessed: 27.06.2020).
17. Razumova O.V., Bazhenov M.S., Nikitina E.A., Nazarova L.A., Romanov D.V., Chernook A.G., Sokolov P.A., Kuznetsova V.M., Semenov O.G., Karlov G.I., Kharchenko P.N., Divashuk M.G. Molecular analysis of gibberellin receptor gene GID1 in *Dasypyrum villosum* and development of DNA marker for its identification // *RUDN J. Agron. Animal Ind.* 2020. Vol. 15. N 1. P. 62–85.
18. Lischer H.E.L., Shimizu K.K. Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species // *BMC Bioinformatics*. 2017. Vol. 18. N 1. P. 474.
19. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. Vol. 19. N 5. P. 455–477.
20. Huang X., Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program // *Genome Res.* 1999. Vol. 9. N 9. P. 868–877.
21. Zaharia M., Bolosky W.J., Curtis K., Fox A., Patterson D., Shenker S., Stoica I., Karp R.M., Sittler T. Faster and more accurate sequence alignment with SNAP // *arXiv:1111.5572 [cs, q-bio]*. 2011.

22. Garrison E., Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing // arXiv:1207.3907 [q-bio]. 2012.
23. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. N 16. P. 2078–2079.
24. Nicholas K.B., Nikolai H.B., Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Pittsburgh Supercomputing Center's National Resource for Biomedical Supercomputing, 1997.
25. Choi Y., Chan A.P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels // Bioinformatics. 2015. Vol. 31. N 16. P. 2745–2747.
26. NCBI Conserved Domain Search [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (accessed: 29.06.2020).
- Поступила в редакцию 14.05.2020 г.
После доработки 30.06.2020 г.
Принята в печать 07.07.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Molecular analysis of the gibberellin signaling pathway genes in cultivated rye (*Secale cereale* L.)

M.S. Bazhenov¹, A.G. Chernook¹, M.G. Divashuk^{1,2,*}

¹Laboratory of Applied Genomics and Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya st. 42, Moscow, 127550, Russia;

²Center for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st. 49, Moscow, 127550, Russia;

*e-mail: divashuk@gmail.com

Gibberellin signaling pathway genes encoding the DELLA protein and gibberellin receptor *GID1* were sequenced in several varieties (Alpha, Valdai, Orlovskaya 9, Pracha) and one line of rye (EM-1) using next generation methods. The revealed multiple alleles of these genes differ mainly in single-nucleotide polymorphisms, and less frequently in insertions and deletions. Most of the detected mutations turned out to be synonymous or located in the non-coding regions of the genes. Changes in the amino acid sequences of proteins associated with other mutations are probably functionally neutral. Mutations similar to wheat reduced-height gibberellin-insensitive alleles were not detected.

Keywords: *Secale cereale*, rye, gibberellins, reduced height, genes, *DELLA*, sequencing

Сведения об авторах

Баженов Михаил Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: mikhabazhenov@gmail.com

Черноок Анастасия Геннадиевна — мл. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: irbis-sibri@yandex.ru

Дивашук Михаил Георгиевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии, доцент кафедры генетики, селекции и семеноводства Российского государственного аграрного университета — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: divashuk@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ *Aspergillus ochraceus* L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью

А.А. Осмоловский^{1,*}, А.В. Орехова^{1,2}, Э. Конти², В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров³¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²"La Sapienza" University of Rome, Piazzale Aldo Moro, 5, Rome, 00185, Italy;³Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Из культуральной жидкости микромицета *Aspergillus ochraceus* L-1 высаливанием сульфатом аммония с последующими диализом и депигментацией на фенолоанилиноформальдегидной смоле при рН буфера 8,2 был получен комплексный препарат протеолитических ферментов с удельной плазминоподобной активностью не менее 890 Е_{рNA}/мг и удельной активаторной к протеину С активностью не менее 130 Е_{рNA}/мг. Сравнение полученного препарата по казеинолитической, фибринолитической, фибриногенолитической и плазминоподобной активности с коммерческими аналогами — террилитином, трипсином и стрептокиназой — показало его перспективность для использования в качестве средства для разжижения гнойно-ожоговых ран и фибриновых сгустков. Полученный комплексный препарат протеиназ имел высокую стабильность при хранении в условиях отрицательных температур сроком до 9 мес.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитическая активность, ферментные препараты, стабильность ферментов, депигментация, гемостатически активные средства

Препараты протеолитических ферментов широко используются в различных областях: в пищевой и легкой промышленности, химической промышленности, медицине [1, 2]. Большая доля таких препаратов приходится на протеазы микроорганизмов, в частности мицелиальных грибов [2, 3]. Хорошо известно, что микромицеты являются высокоактивными продуцентами протеолитических ферментов. Их легко культивировать на простых по составу средах, образуемые ими протеазы секретируются в окружающую среду, что значительно упрощает процесс их получения [4, 5]. Среди микромицетов разных систематических и эколого-трофических групп наибольшую протеолитическую активность проявляют представители рода *Aspergillus*, в секрете большинства из которых присутствуют кислые, нейтральные и щелочные протеиназы [6–10]. Это свойство, а также различия в субстратной специфичности образуемых аспергиллами протеиназ позволяют получать при их культивировании ферментные препараты для решения разных задач.

Препараты протеолитических ферментов, нашедшие или имеющие потенциальное применение в медицинской практике для терапии ожоговых и гнойных ран, фибринолиза и диагностики белков системы гемостаза, отличаются по чистоте,

спектру активности и направленности действия. В связи с этим постоянно ведется поиск и получение новых препаратов, способных превзойти аналоги по каким-либо характеристикам [1, 3, 10–13]. Ряд протеиназ аспергиллов, полученных в последнее время, в условиях *in vitro* показал эффективность гидролиза компонентов тромба [6, 10, 14]. В связи с этим исследования протеолитических ферментов, активных по отношению к белкам системы гемостаза, представляются чрезвычайно актуальными.

Одним из перспективных продуцентов протеиназ является микромицет *Aspergillus ochraceus* L-1. Он образует несколько изоферментов — щелочных сериновых протеиназ, близких по физико-химическим свойствам и обладающих плазминоподобной (фибринолитической) активностью и активирующим воздействием на протеин С — антикоагулянтный белок кровотока, препятствующий чрезмерному тромбообразованию [14–16]. Протеиназы *A. ochraceus* L-1 могут найти применение как в терапии, так и в диагностике заболеваний системы гемостаза.

Целью работы было получение и изучение стабильности в разных условиях хранения комплексного препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. ochraceus* L-1.

Материалы и методы

Получение препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. ochraceus* L-1. Культуру *A. ochraceus* L-1, выросшую в течение 7 сут в пробирке на скошенном сусло-агаре, переносили в качалочную колбу объемом 750 мл со 100 мл среды, содержащей сусло, глюкозу и пептон [14]. Культивирование проводили в течение 2 сут при 28°C и скорости вращения платформы 200 об./мин в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (BioSan, Латвия). После этого часть полученного посевного материала переносили в качалочные колбы со средой состава (в %): глюкоза — 3,5, крахмал — 0,125, гидролизат рыбной муки — 1,0, пептон — 0,1, NaCl — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05, pH 5,5–6,0 [14] с последующим культивированием в течение 2 сут при тех же условиях. По истечении срока культивирования из культуральной жидкости, предварительно отделенной от биомассы микромицета фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия), проводили осаждение секретированных протеаз сульфатом аммония при степени насыщения 0,7, как было показано ранее [17]. Осадок, содержащий протеазы микромицета, отделяли центрифугированием (15000 g, 15 мин, 4°C) на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, Германия). Полученный осадок перерастворяли в 0,001 М Трис-НCl буфере (pH 8,2) и диализовали в диализном мешочке против этого же буфера 12 ч при 4°C. Диализат отделяли от нерастворившейся части центрифугированием (те же условия), супернатант замораживали жидким азотом и высушивали на лиофильной сушилке FreeZone 2.5 (Labconco, США). Полученный препарат хранили при -20°C. На всех этапах получения препарата проводили определение протеолитической активности и концентрации белка.

Депигментация препарата внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1. Протеиназы отделяли от пигмента с помощью фенолоанилинформальдегидной смолы (ФАФ; Олайнский химический завод БИОЛАР, Латвия) [18–21]. Для подготовки анионита к работе ФАФ последовательно отмывали в дистиллированной воде и 0,1 М NaOH (10 об./об.) по 8 ч, после чего отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и снова оставляли на 8 ч в 0,1 М HCl (10 об./об.) с последующим отмыванием дистиллированной водой. Аликвоты заряженной таким образом смолы ФАФ в Cl^- -форме помещали в буферы с разными значениями pH: 0,01 М аммоний-ацетатный буфер (pH 5,0, 6,2 и 7,0) и Трис-НCl буфер (pH 8,2). Навески препарата протеиназ (5 мг/мл), растворенные в дистиллированной воде, либо диализат добавляли к смоле ФАФ, уравновешенной соответствующим буфером. Депигментацию проводили в пробирках типа «Falcon» объемом 50 мл в течение 30 мин «batch-

методом» при постоянном покачивании на мини-рокер шейкере MR-1 (BioSan, Латвия).

Хранение комплексного препарата внеклеточных протеиназ. Депигментированный препарат протеиназ микромицета лиофилизировали и расфасовывали по 2 мг в круглодонные криопробирки «CryoFreeze» объемом 4,8 мл (SSI, США) и помещали на 25, 4, -20 и -80°C сроком на 3, 6, 9 и 12 мес. По истечении срока хранения содержимое пробирок растворяли в 4 мл дистиллированной воды и проводили определение активности протеаз и содержания белка.

Определение протеолитической активности. Активность внеклеточных протеиназ определяли с хромогенными пептидными и белковыми субстратами.

В качестве хромогенных пептидных субстратов использовали H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S2251) для определения плазминоподобной активности и Glp-Pro-Arg-pNA (S2366) для определения активности к протеину С активности [22]. В реакциях использовали 0,05%-ные растворы субстратов в 0,05М Трис-НCl-буфере (pH 8,2).

В случае с субстратом S2251 для проведения реакции к 200 мкл пробы добавляли 50 мкл 0,05М Трис-НCl-буфера (pH 8,2) и 100 мкл раствора субстрата S2251, полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты.

В случае с субстратом S2366 проводили прединкубацию пробы с разведенной в 2 раза плазмой крови человека (НПО «РЕНАМ», Россия) в течение 5 мин, после чего добавляли раствор субстрата и далее проводили реакцию как описано выше.

Оптическую плотность продуктов реакции измеряли при 405 нм. За единицу активности (E_{pNA}) в обоих случаях принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от субстрата за 1 мин.

В качестве белковых субстратов использовали казеин по Хаммерштайну, бычий фибриноген и бычий фибрин (Sigma-Aldrich, США). Для проведения реакций использовали 1%-ные суспензии субстратов в 0,1М Трис-НCl-буфере, pH 8,2.

Активность определяли по концентрации остатков тирозина после гидролиза белков с помощью модифицированного метода Ансона — Хагихары, инкубируя при 37°C 200 мкл пробы и 400 мкл суспензии соответствующего белкового субстрата как описано ранее [23]. Оптическую плотность растворов после реакции измеряли при 275 нм. Активность выражали в мкмоль тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл пробы ($E_{\text{Тир}}$).

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия).

Определение содержания белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорд, для чего к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реак-

тива Coomassie Brilliant Blue G-250 и регистрировали светопоглощение при 595 нм [24].

Сравнение активности комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* с активностью коммерческих аналогов. Навески (от 1 до 5 мг) полученного после депигментации препарата протеиназ *A. ochraceus* и коммерческого препарата Террилитин® (ФГУП «Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток», Россия), трипсина и стрептокиназы (Sigma-Aldrich, США) растворяли в дистиллированной воде и проводили сравнительное определение протеолитической активности и белка как указано выше.

Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf, Германия).

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Комплексный препарат внеклеточных протеолитических ферментов микромицета *A. ochraceus* L-1, полученный после осаждения белков сульфатом аммония из культуральной жидкости и последующих диализа и лиофильной сушки, представлял собой гомогенный порошок светло-бежевого цвета, хорошо растворимый в воде, водных и спиртовых растворах. Раствор препарата в концентрации выше 1 мг/мл имел насыщенную коричневатую окраску с максимумом поглощения пигмента при 336 нм. Микроскопические грибы этого вида синтезируют несколько подобных пигментов, таких как виомеллеин, виоксантин, ксантомегнин и некоторые хромопептиды [25]. Эти соединения имеют хинонную природу и могут быть отделены от целевых белков с помощью анионообменной хроматографии. Для этих целей был использован доступный анионит ФАФ в СГ-форме.

Как видно из табл. 1, концентрация белка в культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 составила 1,73 мг/мл, после высаливания и диализа внеклеточные белки удалось сконцентрировать в 2 раза. Удельная плазминоподобная активность также оказалась больше в 1,5 раза в диализате по сравнению с культуральной жидкостью и составила 46,0 Е_{р_{НА}}/мг, а удельная активаторная к протеину С активность практически не изменилась. Ранее из культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 было выделено 3 протеиназы, 2 из которых обла-

дали плазминоподобной активностью и 1 – выраженной активаторной к протеину С активностью [17, 28]. Возможно, полученные различия в удельной активности по отношению к разным субстратам вызваны соотношением протеолитических ферментов в культуральной жидкости продуцента. Депигментация с помощью ФАФ позволила существенно повысить удельную активность препарата протеиназ. Так, удельная плазминоподобная активность составила 900,3 Е_{р_{НА}}/мг, а удельная активаторная к протеину С – 131,8 Е_{р_{НА}}/мг. Степень очистки препарата составила 30,2 и 9,3 раза соответственно. Использование ФАФ для депигментации культуральной жидкости другого штамма этого микромицета – *A. ochraceus* 513 – напрямую (без предварительных стадий высаливания и диализа) позволило провести очистку со степенью очистки не более 1,25 [22]. Таким образом, ФАФ можно считать достаточно эффективным анионитом для проведения депигментации сконцентрированных внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1.

Для повышения эффективности депигментации на ФАФ препарата внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1 было исследовано связывание пигмента с анионитом при разных значениях рН буфера. Полученные результаты представлены на рис. 1. Видно, что как плазминоподобная, так и активаторная активность была наибольшей при рН 8,2. При этом значении рН наблюдалась и лучшая депигментация. Кроме того, значение рН 8,2 соответствует оптимальному значению рН-активности протеиназ продуцента [15, 26]. При проведении депигментации при значениях рН ниже 5–7 снижалась как удельная протеолитическая активность с обоими субстратами, так и эффективность депигментации. Так, при рН буфера 5,0 эффективность депигментации составляла 53% для плазминоподобной активности и лишь 7% – для активаторной к протеину С активности (рис. 1).

Раствор протеиназ, депигментированный при рН 8,2, лиофильно высушивали; лиофилизат имел бледно-бежевый цвет, в растворенном виде – слегка соломенную окраску. Полученный депигментированный препарат имел удельную плазминоподобную активность не менее 890 Е_{р_{НА}}/мг и удельную активаторную к протеину С активность не менее 130 Е_{р_{НА}}/мг.

Возможности практического применения любого ферментного препарата, особенно препарата протеиназ, должны быть обоснованы, поэтому важно проводить его сравнение с имеющимися аналогами [27].

Таблица 1

Результаты депигментации на ФАФ препарата протеиназ *A. ochraceus*

Стадия	Белок, мг/мл	Удельная плазминоподобная активность, Е _{р_{НА}} /мг	Степень очистки, раз	Удельная активаторная к протеину С активность, Е _{р_{НА}} /мг	Степень очистки, раз
Культуральная жидкость	1,73	29,8±0,7	1,0	14,1±0,1	1,0
Диализат	2,40	46,0±0,7	1,5	14,3±0,1	1,0
Депигментирование на ФАФ	0,15	900,8±1,5	30,2	131,8±1,5	9,3

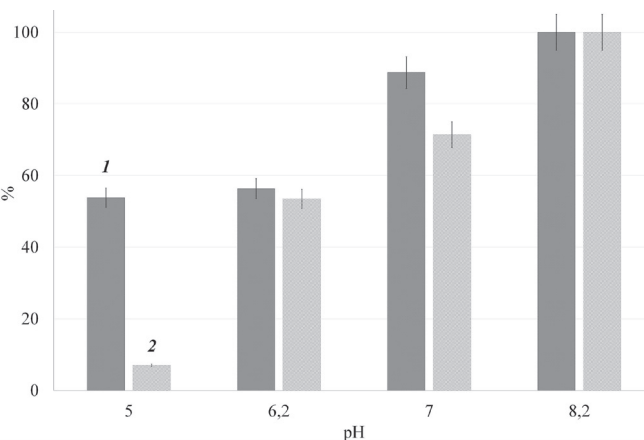


Рис. 1. Эффективность депигментации (%) препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. ochraceus* L-1 при различных значениях pH. 1 – плазминоподобная активность, 2 – активаторная по отношению к протеину С активность.

В табл. 2 показаны результаты сравнения активности препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 с активностью других ферментных препаратов. Была исследована плазминоподобная, фибрино- и фибринолитическая активность, а также неспецифическая казеинолитическая активность полученного препарата с террилитин (препарат внеклеточных ферментов *A. terricola*), трипсином и стрептокиназой. Удельная казеинолитическая активность полученного препарата была сопоставимой с активностью трипсина и почти в 10 раз выше активности стрептокиназы. В случае удельной фибринолитической активности данный препарат оказался активнее в 2 и в 4,7 раза соответственно, чем трипсин и стрептокиназа. Аналогичные результаты были получены при сравнении фибринолитической и плазминоподобной активности указанных препаратов. Несмотря на значения казеинолиза, препарат внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1 проявил выраженность действия в отношении фибрина, что подтверждает полученные ранее для продуцента данные [14]. Превышение полученным препаратом фибринолитической и фибриногенотической активности над стрептокиназой делает возможным его потенциальное применение в медицине, ветеринарии и смежных областях.

В сравнении с террилитин, удельная казеинолитическая активность препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 была в 2,5 раза меньше, в то время как фибринолитическая и плазминоподобная активность была, соответственно, в 2,1 и 2,3 раза выше. При этом фибриногенотическая активность террилитина превышала в 1,27 раз таковую

у полученного препарата. Террилитин® применяется в качестве наружного протеолитического средства для расщепления некротической ткани и разжижения гнойного экссудата и сгустков крови (Регистр. удостоверение РУ № ЛСР-009849/09). Интересно отметить, что оба препарата протеиназ – продукты культивирования аспергиллов разных видов (коммерческий и лабораторный образец) – проявили различия в специфичности к исследуемым хромогенным пептидным субстратам. Меньшая казеинолитическая активность и большая фибринолитическая активность препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 позволяют считать целесообразным его использование в тех же целях.

Ввиду возможности практического применения полученного препарата была изучена его стабильность при хранении в разных температурных режимах (комнатная температура, холодильник, морозильник, глубокая заморозка) на срок до 1 года. Определение плазминоподобной активности и активаторной к протеину С активности, которые были выбраны как маркерные, в образцах препарата с разным хранением представлены на рис. 2А и 2Б соответственно.

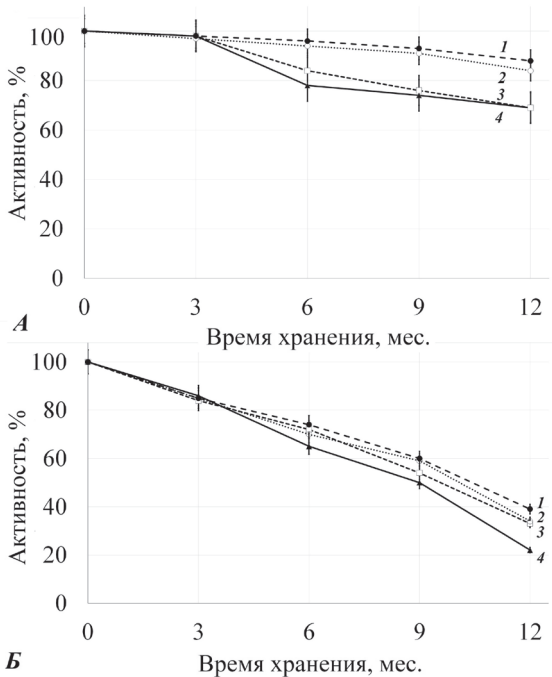


Рис. 2. Стабильность комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 при +25°С (1), +4°С (2), -20°С (3) и -80°С (4). А – сохранение плазминоподобной активности препарата (%), Б – сохранение активаторной по отношению к протеину С активности препарата (%).

Таблица 2

Сравнение активности препарата протеиназ <i>A. ochraceus</i> с активностью других ферментных препаратов				
Препарат	Удельная казеинолитическая активность, Е _{тип} /мг	Удельная фибринолитическая активность, Е _{тип} /мг	Удельная фибриногенотическая активность, Е _{тип} /мг	Удельная плазминоподобная активность, Е _{р_{НА}} /мг
Депигментированный препарат <i>A. ochraceus</i>	129,13±0,7	47,37±0,7	44,93±0,7	18,31±0,7
Террилитин®	316,58±0,7	20,42±0,7	57,28±0,7	8,60±0,7
Трипсин	132,53±0,7	23,86±0,7	44,70±0,7	17,31±0,7
Стрептокиназа	13,68±0,7	10,55±0,7	31,64±0,7	3,01±0,7

Как видно из рис. 2А, препарат оказался стабильным на протяжении всего года. Плазминоподобная активность снижалась незначительно, к 12 мес. хранения она составила от 69% при +25°C до 88% при -80°C. При отрицательных температурах хранения плазминоподобная активность была выше 90% от первоначальной на протяжении 9 мес. хранения. Наибольшая скорость потери стабильности наблюдалась при хранении препарата при +25°C и при +4°C. Оптимальным временем хранения препарата для сохранения им плазминоподобной активности и, как следствие, фибринолитических свойств следует считать 6 мес. Активаторная к протеину С активность снижалась в исследованных условиях хранения более резко (рис. 2Б). Так, остаточная активность за 12 мес. хранения составила от 22% при +25°C до 39% при -80°C. Наилучшими условиями хранения препарата, так же, как и в случае с плазминоподобной активностью, оказалась температура -80°C. При этом при -20°C препарат хранился не хуже. Оптимальным периодом хранения можно

считать также 6 мес., за это время препарат сохраняет около 80% своей активности.

Таким образом, из культуральной жидкости микробицета *A. ochraceus* L-1 высаливанием сульфатом аммония с последующими диализом и депигментацией на ФАФ при рН буфера 8,2 был получен комплексный препарат протеолитических ферментов. Препарат имел выраженную фибринолитическую, плазминоподобную и активаторную к протеину С активность. Сравнение препарата с коммерческими аналогами — терилитином, трипсином и стрептокиназой — показало его перспективность для использования в качестве средства для разжижения гнойно-ожоговых ран и фибриновых сгустков. Полученный комплексный препарат протеиназ имел высокую стабильность при хранении в условиях отрицательных температур сроком до 9 мес.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. Vol. 7: 110.
2. dos Santos Aguilar J.G., Sato H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates // Food Res. Int. 2018. Vol. 103. P. 253–262.
3. 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.
4. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier 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.
5. Шамрайчук И.Л., Лавренова В.Н., Белозерский М.А., Кураков А.В., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е. Активность и спектр внеклеточных пептидаз у фитопатогенных микромицетов *Fusarium anguoides* и *F. sambucinum* // Микол. фитопатол. 2016. Т. 50. № 4. С. 250–256.
6. 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.
7. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Ability of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus sydowii* to affect proteins of the human haemostatic system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 1. P. 20–24.
8. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Secretion of proteinases with fibrinolytic activity by micromycetes of the genus *Aspergillus* // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 1. P. 39–42.
9. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Пискунова Н.Ф., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus flavus* и *A. oryzae* как продуценты протеиназ — активаторов белков системы гемостаза человека // Микол. фитопатол. 2019. Т. 53. № 3. С. 183–185.
10. Shilpa H.K., Ambekar J.G., Dongre N.N., Siddalingeshwara K.G. Application of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus tamarii* — in vitro studies // Eur. J. Pharm. Med. Res. 2019. Vol. 6. N 12. P. 560–562.
11. Craik C.S., Page M.J., Madison E.L. Proteases as therapeutics // Biochem. J. 2011. Vol. 435. N 1. P. 1–16.
12. Chanalia P., Gandhi D., Jodha D., Singh J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview // Rev. Med. Microbiol. 2011. Vol. 22. N 4. P. 96–101.
13. Kumar L., Jain S.K. Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications // Int. J. Sci. Res. Biol. Sci. 2018. Vol. 5. N 4. P. 114–118.
14. 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.
15. Osmolovskiy A.A., Kreier 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.
16. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility of application of extracellular proteases of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D for determination of the protein C content in human blood plasma // Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B. Biomed. Chem. 2018. Vol. 12. N 2. P. 164–166.
17. Komarevtsev S.K., Popova E.A., Kreier V.G., Miroshnikov K.A., Osmolovskiy A.A. Purification of the protease activator of protein C of human blood plasma produced by the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D // Applied Biochem. Microbiol. 2020. Vol. 56. N 1. P. 39–44.
18. Шатаева Л.К., Крейер В.Г., Покровская С.С., Радзявичус К.И., Самсонов Г.В. Влияние аминокислотного состава белка на его связывание с карбоксильными катионитами // Высокомолекулярные соединения. 1985. Т. 27. № 1. С. 46–51.
19. Шатаева Л.К., Марина В.П., Радзявичус К.И., Мельникова С.К., Самсонов Г.В. Влияние набухания ани-

онита ФАФ на его сорбционные свойства // Прикл. биохим. микробиол. 1982. Т. 18. № 1. С 65–70.

20. 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.

21. Belakhov V.V., Momot N.N. Development of novel sorption method of preparation of high-purified α -amylase for the creation of enzyme drugs // In the World of Scient. Discov. 2010. Vol. 6. N 1. P. 173–175.

22. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N. S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma // Applied Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

23. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier 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.

24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. N 1–2. P. 248–254.

25. Lagashetti A.C., Dufossé L., Singh S.K., Singh P.N. Fungal pigments and their prospects in different industries // Microorganisms. 2019. Vol. 7. N 12: 604.

26. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. Properties of extracellular proteinase – an activator of protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus* // Applied Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 95–101.

27. Kotb E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from Kishk, a traditional Egyptian fermented food // Applied Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 34–43.

Поступила в редакцию 12.04.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Production and stability of a complex preparation of proteinases by *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity

A.A. Osmolovskiy^{1,*}, A.V. Orekhova^{1,2}, E. Conti², V.G. Kreier¹, N.A. Baranova¹, N.S. Egorov³

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²“La Sapienza” University of Rome, Piazzale Aldo Moro, 5, Rome, 00185, Italy;

³International Biotechnological Center, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

A complex preparation was obtained from the culture fluid of micromycete *Aspergillus ochraceus* L-1 by salting out with ammonium sulfate followed by dialysis and depigmentation to phenolalanine formaldehyde resin at a pH of 8.2 with a specific plasmin-like activity of at least 890 E_{pNA}/mg and a specific activator for protein C activity of less than 130 E_{pNA}/mg was. Comparison of the obtained preparation with caseinolytic, fibrinolytic, fibrinogenolytic and plasmin-like activity with commercial analogues terrilithin, trypsin and streptokinase showed its promise for use as a means for thinning purulent burn wounds and fibrin clots. The resulting complex preparation of proteinases had high storage stability at low temperatures for up to 9 months.

Keywords: micromycete proteinases, fibrinolytic activity, enzymes preparations, enzyme stability, depigmentation, hemostatic-active compounds

Сведения об авторах

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

Орехова Анастасия Владимировна — вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Конти Элеонора (Eleonora Conti) — магистр университета «Ла Сапиенца». Тел.: +39 06 4991 2791; e-mail: conti.1581596@studenti.uniroma1.it

Крейер Валериана Георгиевна — 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

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: baranovana2012@mail.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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.213.39

Исследование влияния однонитевого разрыва на механические параметры ДНК методом молекулярной динамики**О.И. Волох, Г.А. Армеев, Е.С. Трифонова, О.С. Соколова****Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

Раннее обнаружение и восстановление поврежденной ДНК имеет важное значение для функционирования и выживания клеток. Недавно предложенный механизм формирования внутринуклеосомных петель предполагает релаксацию сверхспирализации ДНК, накопленной при транскрипции через поврежденный хроматин. На степень спирализации ДНК влияют механические свойства и структура двойной спирали. В данной работе мы исследовали влияние введения однонитевого разрыва на механические свойства фрагмента ДНК методом молекулярной динамики. Был сделан вывод о том, что введение однонитевого разрыва приводит к снижению жесткости и повышению эластичности поврежденной, по сравнению с интактной, молекулы ДНК, что может привести к ослаблению сверхспирализации дефектной ДНК и к остановке фермента РНК-полимеразы.

Ключевые слова: ДНК, молекулярная динамика, модуль Юнга, однонитевой разрыв, жесткость, упругость

Генетический материал клетки находится под постоянным воздействием факторов внешней и внутренней среды, приводящим к возникновению повреждений в структуре ДНК. Для устранения образующихся нарушений в клетке существуют процессы репарации ДНК, однако в случае их некорректной работы может происходить накопление нарушений, ведущее к развитию различных патологий — тяжелых нарушений метаболизма, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. Чаще всего при повреждении молекулы ДНК наблюдается образование однонитевых разрывов. Они могут возникать ежедневно в огромных количествах в результате спонтанного гидролиза ковалентных связей либо вследствие воздействия активных форм кислорода [3].

Раннее обнаружение и восстановление поврежденной ДНК имеет важное значение для функционирования и выживания клеток. Согласно проводимым в последнее время исследованиям, организация ядерной ДНК в хроматин [4, 5] может изменять процесс поиска повреждений ферментами системы репарации. Новые данные свидетельствуют о существовании хроматин-специфического механизма, позволяющего обнаруживать одиночные разрывы нематричной цепи ДНК при транскрипции ферментом РНК-полимеразой (РНКП). Было показано [6, 7], что одиночные разрывы нематричной цепи ДНК способны приводить к нуклеосом-специфичной остановке РНКП *Escherichia coli* после преодоления ферментом участка разрыва, на расстоянии

порядка 7–12 п.н. от него. В одной из работ [6] была определена периодичность остановок РНКП в положениях: (+24), (+34) и (+44) нуклеосомной ДНК. Была выдвинута гипотеза о том, что причиной подобной остановки является формирование внутринуклеосомных петель [7]. Этот механизм предполагает релаксацию сверхспирализации ДНК, накопленной при транскрипции через поврежденный хроматин. На эффективность релаксации сверхспирализации ДНК влияют механические свойства и структура двойной спирали. Однако для лучшего понимания процессов репарации и транскрипции необходимы структурные данные, в отсутствие которых хорошо зарекомендовало себя моделирование системы *in silico*. В данной работе методом молекулярной динамики (МД) исследовалось влияние введения однонитевого разрыва на механические свойства фрагмента ДНК.

Материалы и методы

Все МД-расчеты для выполнения задачи по оценке влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК проводились с использованием программного пакета Gromacs 4.6.5 [8] и силового поля Amber99sb-ildn [9].

Расчет траекторий проводился в NPT-ансамбле при температуре 300°K (термостат Берендсена) и изотропном давлении 1 бар (баростат Берендсена); использованная модель воды — SPC-E [10]. Для потенциалов Леннарда-Джонса [11], для расчета электростатических взаимодей-

ствий использовался метод PME (particle mesh Ewald) [12]. В обоих случаях радиус отсечки составил 1,8 нм. Шаг интегрирования – 1 фс.

Создание моделей исследуемых структур фрагмента ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом. Для исследования влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК была использована та же модельная (20 п.н.) последовательность ДНК из 603 нуклеосом-позиционирующей последовательности (НПП), что и в соответствующей работе [6]. Однонитевой разрыв был введен в (+12)-положение цитозина (С) нематричной цепи ДНК [6]:

Последовательность матричной цепи:
3'-GGGCCACAGAGGCGGGCGGA-5'.

Последовательность нематричной цепи:
5'-CCCGGTGTCTCCGCCCGCCT-3'.

Структура для проведения вычислительных экспериментов была построена в программе UCSF Chimera [13]. Введение однонитевого разрыва производилось нарушением ковалентной связи сахарофосфатного остова между кислородом дезоксирибозы гуанина и фосфором фосфатной группы цитозина нематричной цепи. Введение однонитевого разрыва никазами *in vivo* сопровождается гидролизом, в результате чего образуются – ОН-группа на дезоксирибозе гуанина и ОН-группа на фосфатной группе цитозина. Аналогичная модификация остатков была произведена для исследуемой *in silico* структуры с однонитевым разрывом.

Оценка влияния введения однонитевого разрыва на жесткость ДНК. Для подготовки структур к проведению управляемой МД системы релаксировались: были проведены расчеты равновесной молекулярной динамики исследуемых структур ДНК в водном растворе с физиологической концентрацией ионов Na^+ и Cl^- в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом. Роль двухвалентных ионов не исследовалась. Параметры расчетной ячейки: размер – $6,0 \times 15,0 \times 6,0$ нм; количество атомов – 53049 для интактной ДНК и 53057 для ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП; количество противоионов Na/Cl в системах – 87/49 и 86/49 соответственно.

Расчет модулей Юнга растяжения сравниваемых последовательностей ДНК производился с применением управляемой МД. Длины траектории составили 2 нс.

В ходе вычислительного эксперимента фиксировалась верхняя пара азотистых оснований DG5 и DC3, фиксация осуществлялась по трем координатам (x, y, z). Противоположному концу фрагмента нуклеиновой кислоты (атомы фосфора цепи P19 и P21) сообщалось ускорение, равное 6, 8, 10 нм/пс² по координате y, соответствующие приложенные силы равнялись 9, 12, 15 ккал/моль Å.

Расчет модуля растяжения производился по формуле:

$$E = \frac{F}{A_0} \cdot \frac{L_0}{\Delta L}, \quad (1)$$

где F – сила, приложенная к концу цепи (в Ньютонах), A_0 – поверхность приложения силы (ангстрем), L_0 – начальное расстояние между центрами масс концевых пар атомов фосфора (нм), ΔL – относительное удлинение соответствующего расстояния (нм).

Оценка влияния введения однонитевого разрыва на характер стэкинг-взаимодействий в области разрыва ДНК. Были проведены расчеты равновесной МД структур интактной ДНК и ДНК с однонитевым разрывом в водном растворе с физиологической концентрацией ионов Na^+ и Cl^- в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом. Параметры расчетной ячейки: размер – $5,7 \times 9,4 \times 5,6$ нм; количество атомов – 28693 для интактной ДНК и 25878 для ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП; количество противоионов Na/Cl в системах – 65/27 и 64/27 соответственно. Длина траекторий составила 20 нс. Расчет параметров подвижности для соседних нуклеотидных пар производился с использованием программы 3DNA (<http://x3dna.org>) [14–16] на основании координат, полученных из траекторий молекулярной динамики.

Оценивались следующие параметры соседних нуклеотидных пар:

- 1) Сдвиг вдоль оси x, D_x ;
- 2) Сдвиг вдоль оси y, D_y ;
- 3) Сдвиг вдоль оси z, D_z ;
- 4) Угол наклона между плоскостями соседних пар нуклеотидов, r ;
- 5) Угол наклона между плоскостями соседних пар нуклеотидов, p ;
- 6) Угол «закручивания» между плоскостями соседних пар нуклеотидов, w .

Результаты и обсуждение

Для оценки влияния однонитевого разрыва на механические свойства фрагмента ДНК был применен разработанный нами ранее подход [17], изучали параметры жесткости и гибкости.

Жесткость оценивали с применением управляемой МД. В этом методе на отдельные атомы системы налагается дополнительный потенциал, который сообщает ускорение по определенным степеням свободы. График зависимости расстояний между центрами масс пар атомов фосфора на траектории молекулярной динамики для ускорения 10 нм/пс² приведен на рис. 1. Он показывает, что в начале управляемой динамики структуры ведут себя аналогичным образом до достижения расстояния между концевыми фосфатами ~6,5 нм. Предположительно, к этому моменту изменение стэкинг-взаимодействий доходит до нуклеотидных пар, соседних с однонитевым разрывом, и структуры начинают вести себя по-

разному. Во всех случаях при приложении ускорения структура ДНК с одонитевым разрывом растягивалась быстрее, чем аналогичная интактная структура, что свидетельствует в пользу меньшей жесткости структуры ДНК с одонитевым разрывом. Это подтверждается расчетными данными модуля Юнга: $(3,0 \pm 0,05) \times 10^9$ Па — для интактной ДНК, $(1,8 \pm 0,08) \times 10^9$ Па — для ДНК с одонитевым разрывом. Для расчета модуля упругости использовались участки траектории, соответствующие изменениям длин структуры в диапазоне 6,5–7,5 нм.

Для оценки влияния введения одонитевого разрыва на гибкость фрагмента ДНК определяли параметры стэкинг-взаимодействий между соседними парами нуклеотидов фрагмента ДНК. Данный подход широко используется для оценки гибкости ДНК [15, 18–19].

Проводилась оценка изменений следующих параметров из координат траекторий (рис. 2). Основным параметром для оценки гибкости является угол наклона между соседними парами нуклеотидов между плоскостями комплементарных пар вдоль оси у (Roll) [15, 18–19]. Мы также обратили



Рис. 1. График зависимости расстояний между центрами масс пар атомов фосфора на траектории управляемой молекулярной динамики. По оси x — шаг траектории (нс), по оси y — расстояние между центрами масс пар атомов Р (нм).

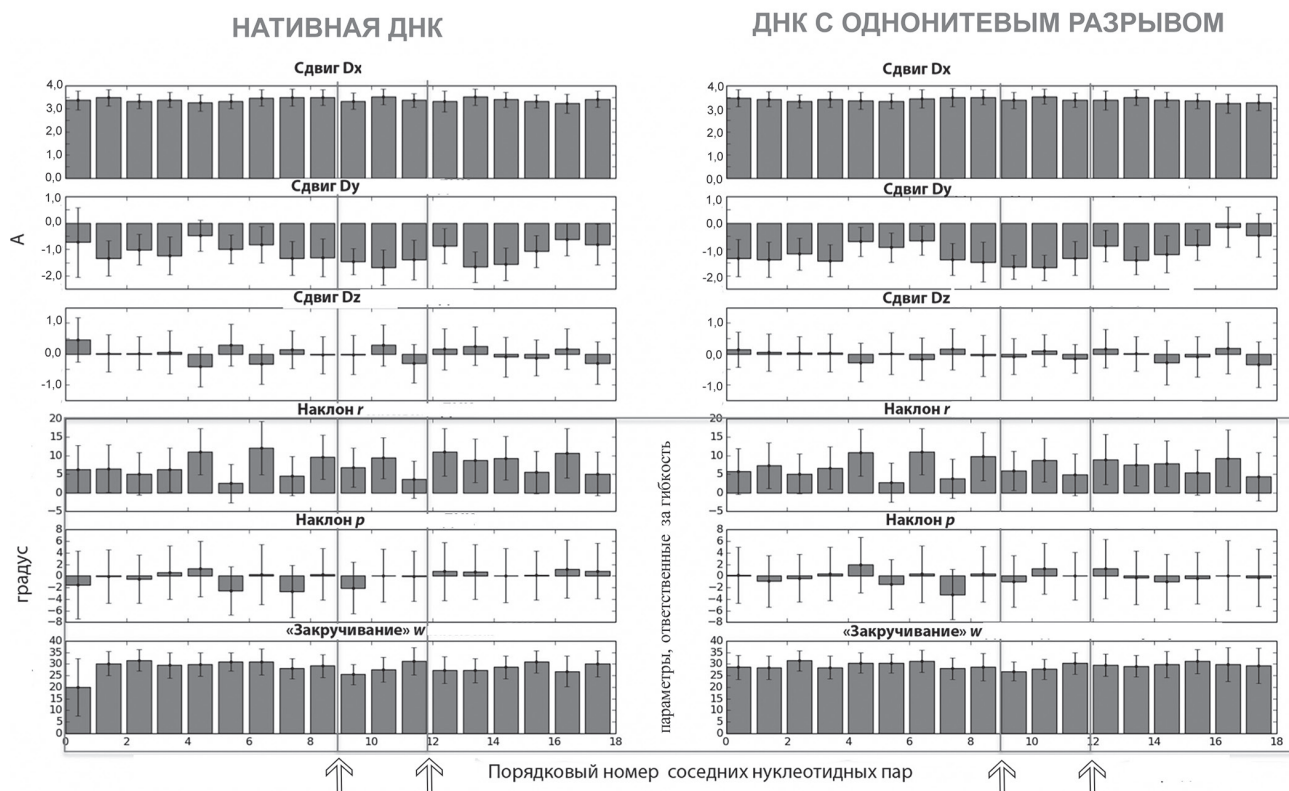


Рис. 2. Рассчитанные параметры стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар. Слева — данные для интактной структуры ДНК, справа — для ДНК с одонитевым разрывом, вертикальные выделенные стрелками блоки — соседние с одонитевым разрывом нуклеотидные пары. По оси y — значение смещения (в Å — для значений сдвига, в градусах — для углов наклона и «закручивания»). По оси x — порядковый номер соседних нуклеотидных пар. Доверительный интервал представляет собой стандартное отклонение рассчитанной величины на траектории.

внимание на угол наклона между плоскостями комплементарных нуклеотидных пар вдоль оси x (Tilt), и на угол поворота в плоскости комплементарных пар (Twist) (выделены горизонтальным блоком на рис. 2). Интерес представляет величина стандартного отклонения исследуемого параметра, так называемый «объем конформационного пространства» [20], в котором исследуемая переменная (величина угла) находится большую часть времени (рис. 3).

Из полученных графиков (рис. 2, 3) следует, что отношение отклонений параметров стэкинг-взаимодействий участков ДНК с одонитевым разрывом от соответствующих показателей ДНК без разрыва лежат в пределах 0,8–1,2 для ротационных и трансляционных степеней свободы. Значимых различий в поведении структур с одонитевым разрывом и без разрыва в ходе данного вычислительного эксперимента не выявлено. Это может быть связано с тем, что параметры стэкинг-взаимодействий в силовых полях, используемых в молекулярной динамике, существенно переоценены [21]. Таким образом, использование управляемой МД, где стэкинг-взаимодействия нарушаются за счет приложения силы, имеет преимущество, так как способно выявить различие в поведении систем с одонитевым разрывом и без него, в отличие от равновесной МД. Ранее мы исследовали методами равновесной и управляемой МД молекулярные модели фрагментов ДНК

с оценкой модуля Юнга растяжения, а также проводили сравнение поведения систем с экспериментальными данными [17]. В работе были продемонстрированы адекватное поведение молекулярно-динамических систем, совпадение порядковых значений расчетных данных с экспериментальными [22–24] и сопоставимость результатов расчетов с литературными данными [25], свидетельствующие в пользу адекватности МД-моделей комплексов ДНК и информативности использованного подхода, что послужило основанием для его использования к проведению расчетов и построению МД-систем для исследований других объектов ДНК, в том числе с белками в физиологическом ионном окружении.

Ионное окружение играет важную роль в функционировании ДНК-белковых комплексов в клетке. В частности, двухвалентные катионы способствуют компактизации хроматина [26, 29]. Взаимодействие между ионами двухвалентных металлов и ДНК было изучено нами ранее в системе с нуклеосомой [27] и с ДНК-связывающим белком прокариот Dps [28]. Мы показали, что заряды на ДНК эффективно экранированы белками на границе взаимодействия белок–ДНК. Появление одноцепочечного разрыва не изменит общего числа и расположения зарядов на ДНК по сравнению с интактной ДНК. Таким образом, ожидается, что влияние двухвалентных ионов на жесткость ДНК в обеих системах будет схожим

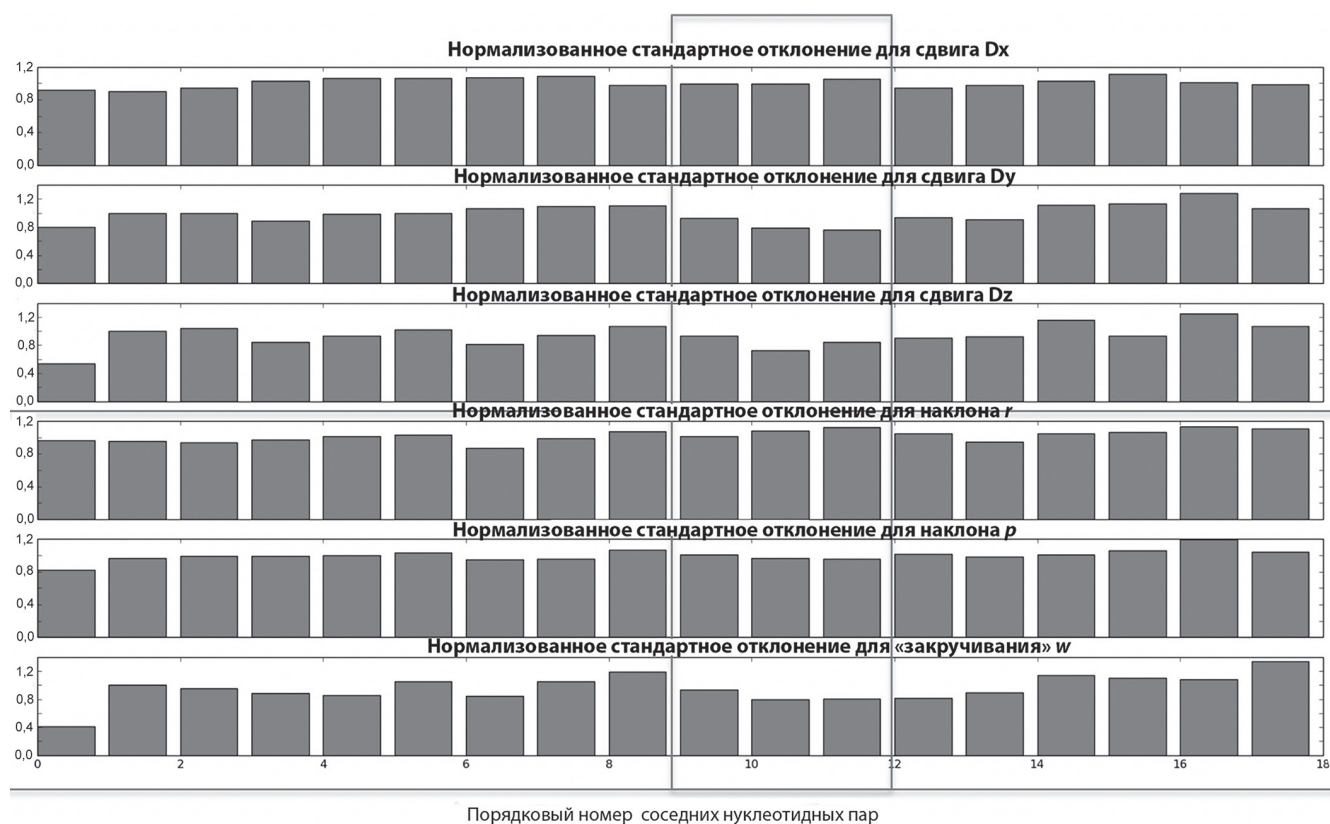


Рис. 3. Нормализованные значения стандартного отклонения параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар. По оси x — нуклеотидные пары, по оси y — значения нормализованных по интактной ДНК стандартных отклонений параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар.

и повлияет лишь на абсолютную величину, но не на относительное изменение механических характеристик ДНК.

В результате анализа полученных данных можно сделать вывод о том, что введение однонитевого разрыва приводит к снижению жесткости и повышению эластичности молекулы ДНК с однонитевым разрывом, по сравнению с интактной ДНК. Это может привести к релаксации сверхспирализации дефектной молекулы, связанной с нуклеосомой, и к остановке фермента РНКП в процессе транскрипции. Биологические процессы, связанные с ферментативным прочтением ДНК, характеризуются динамическим поведением двойной спирали, зависящим от первичной последовательности ДНК и «ненарушенности» связей между остатками. Таким образом, релаксация сверхспирализации может играть одну из ключевых ролей для осуществления транскрипции и преодоления нуклеосомных барьеров [30–32].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klein H.L., Bačinskaja G., Che J., et al. Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways // *Microb. Cell.* 2019. Vol. 6. N 1. P. 1–64.
2. Higo T., Naito A., Sumida T., et al. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8: 15104.
3. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* 1993. Vol. 362. N 6422. P. 709–715.
4. Kulaeva O., Gaykalova D., Pestov N., Golovastov V., Vassilyev D., Artsimovitch I., Studitsky V. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
5. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 43. P. E5787–E5795.
6. Gerasimova N.S., Pestov N. A., Kulaeva O.I., Nikitin D.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. Repair of chromatinized DNA // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 3. P. 122–126.
7. Pestov N.A., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // *Sci. Adv.* 2015. Vol. 1. N 6: e1500021.
8. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., the GROMACS development team. GROMACS User Manual version 4.6.5. 2013.
9. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field // *Proteins.* 2010. Vol. 78. N 8. P. 1950–1958.
10. Berendsen H.J.C., Grigera J.R., Straatsma T.P. The missing term in effective pair potentials // *J. Phys. Chem.* 1987. Vol. 91. N 24. P. 6269–6271.
11. Levitt M., Hirshberg M., Sharon R., Daggett V. Potential energy function and parameters for simulations of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution // *Comput. Phys. Commun.* 1995. Vol. 91. N 1–3. P. 215–231.
12. Darden T.A., Pedersen L.G. Molecular modeling: an experimental tool // *Environ. Health Perspect.* 1993. Vol. 101. N 5 P. 410–412.
13. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157. N 1. P. 281–287.
14. Lu, X.-J., Shakked Z., Olson W.K. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 300. N 4. P. 819–840.
15. Colasanti A.V., Lu X. J., Olson W.K. Analyzing and building nucleic acid structures with 3DNA // *J. Vis. Exp.* 2013. N 74: e4401.
16. Lu X. J., Olson W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // *NAR.* 2003. Vol. 31. N 17. P. 5108–5121.
17. Volokh O.I., Bozdaganyan M.E., Shaitan K.V. Assessment of the DNA-binding properties of actinomycin and its derivatives by molecular dynamics simulation // *Biophysics.* 2015. Vol. 60. N 6. P. 893–899.
18. Kumar R., Grubmüller H. do_x3dna: a tool to analyze structural fluctuations of dsDNA or dsRNA from molecular dynamics simulations // *Bioinformatics.* 2015. Vol. 31. N 15. P. 2583–2585.
19. Lankaš F., Šponer J., Langowski J., Cheatham T.E. DNA basepair step deformability inferred from molecular dynamics simulations // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85. N 5. P. 2872–2883.
20. Olson W.K., Zhurkin V.B. Modeling DNA deformations // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10. N 3. P. 286–297.
21. Banáš P., Mládek, A., Otyepka, M., Zgarbová, M., Jurečka, P., Svozil, D., Lankaš F., Šponer, J. Can we accurately describe the structure of adenine tracts in B-DNA? Reference quantum-chemical computations reveal overstabilization of stacking by molecular mechanics // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8. N 7. P. 2448–2460.

22. Cocco S., Marko J. F., Monasson R. Theoretical models for single-molecule DNA and RNA experiments: from elasticity to unzipping // *C. R. Phys.* 2002. Vol. 3. N 5. P. 569–584.
23. Marko J.F., Cocco S. 2003. The micromechanics of DNA // *Phys World*. 2003. Vol. 16. N 3. P. 37–41.
24. Bloom K.S. Beyond the code: the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis // *Chromosoma*. 2008. Vol. 117. N 2. P. 103–110.
25. Sobell H.M. Actinomycin and DNA transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985. Vol. 82. N 16. P. 5328–5331.
26. Liu Y.F., Ran S.Y. Divalent metal ions and intermolecular interactions facilitate DNA network formation // *Colloids Surf. B*. 2020. Vol. 194: 111117.
27. Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaitan A.K. Molecular dynamics study of the ionic environment and electrical characteristics of nucleosomes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N. 4. P. 173–176.
28. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K., Danilova Y., Kovalenko V., Chertkov O., Feofanov A.V., Krupyanskii Yu.F., Sokolova O.S. Projection structures reveal the position of the DNA within DNA-Dps Co-crystals // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 517. N 3. P. 463–469.
29. Jiang Y., Zhang H., Feng W., Tan T. Refined dummy atom model of Mg²⁺ by simple parameter screening strategy with revised experimental solvation free energy // *J. Chem. Inf. Model.* 2015. Vol. 55. N 12. P. 2575–2586.
30. Bondarenko V., Steele L., Ujvari A., Gaykalova D., Kulaeva O., Polikanov Y., Luse D., Studitsky V. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell*. 2006. Vol. 24. N 3. P. 469–479.
31. Hsieh F.K., Fisher M., Ujvari A., Studitsky V., Luse D. Histone Sin mutations promote nucleosome traversal and histone displacement by RNA polymerase II // *EMBO Rep.* 2010. Vol. 11. N 9. P. 705–710.
32. Kulaeva O., Gaykalova D., Pestov N., Golovastov V., Vassilyev D., Artsimovitch I., Studitsky V. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
33. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V. “Lomonosov”: Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary high performance computing: from petascale toward exascale* / Ed. S.V. Jeffery. Boca Raton: CRC Press, 2013. P. 283–307.

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 22.06.2020 г.

Принята в печать 03.07.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Investigation of the effect of a single-strand break on the mechanical parameters of DNA by molecular dynamics method

O.I. Volokh, G.A. Armeev, E.S. Trifonova, O.S. Sokolova*

*Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Early detection and repair of damaged DNA is important for cell functioning and survival. The recently proposed mechanism of intra-nucleosome loop formation suggests relaxation of DNA supercoiling accumulated during transcription through damaged chromatin. The degree of DNA relaxation is affected by the mechanical properties and structure of the double helix. In this paper we investigated the consequences of the introduction of a single-stranded break on the mechanical properties of a DNA fragment by molecular dynamics. It was concluded that the introduction of a single-stranded break leads to decreased stiffness and higher elasticity of the damaged DNA molecule as compared to the intact one. This, in turn, may lead to relief of the supercoiling of the defective DNA and arrest of the enzyme.

Keywords: DNA, molecular dynamics, Young modulus, single-stranded break, stiffness, elasticity

Сведения об авторах

Волох Олеся Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com

Армеев Григорий Алексеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: satary@yandex.ru

Трифорова Елизавета Сергеевна — инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: nyska57@gmail.com

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.088.1

Влияние госсипола на структуру нуклеосом

Н.В. Малюченко^{1,*}, Д.О. Кошкина¹, А.Н. Коровина¹, Н.С. Герасимова¹,
М.П. Кирпичников¹, В.М. Студитский^{1,2}, А.В. Феофанов^{1,3}

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

²Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: mal_nat@mail.ru

Госсипол является высокоактивным соединением, обладающим противовирусными, антиоксидантными, противомикробными, противомаларийными и противоопухолевыми свойствами. Известно, что противоопухолевый эффект госсипола связан с генотоксичностью, однако взаимодействие госсипола с хроматином не было изучено. В данной работе методом микроскопии одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии установлено, что при концентрациях 10 мкМ и выше госсипол вызывает значительные структурные изменения в конформации нуклеосомной ДНК на октамере гистонов. Эти изменения затрагивают не менее 35 п.н. нуклеосомной ДНК, увеличивают расстояние между соседними супервитками нуклеосомной ДНК в этой области до 9 нм или более и вызваны разворачиванием нуклеосомной ДНК. Наличие участков линкерной ДНК несколько увеличивает устойчивость нуклеосом к действию госсипола по сравнению с кор-нуклеосомами. При концентрации 30 мкМ и выше госсипол полностью разрушает структуру нуклеосом, вызывая диссоциацию гистонов от ДНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемая *in vivo* генотоксичность госсипола может быть связана с прямым воздействием госсипола на хроматин, приводящим к нарушению структуры нуклеосом.

Ключевые слова: госсипол, нуклеосома, хроматин, флуоресценция, Фёрстеровский резонансный перенос энергии

Госсипол является природным соединением – вторичным метаболитом, синтезируемым растениями рода *Gossypium* (хлопчатник) в качестве защиты от патогенных микроорганизмов и травоядных животных [1]. Он представляет собой динафталевый альдегид с полифенольными гидроксильными группами и может существовать в виде (+)- и (-)-энантиомеров из-за вращения вокруг бинафтильной связи [2]. Являясь биологически активным соединением, госсипол обладает противовирусными, интерферон-индуцирующими, антиоксидантными, противомикробными, противомаларийными и противоопухолевыми свойствами [3]. В настоящее время ведутся более 28 клинических испытаний госсипола в качестве отдельного препарата и в комбинации с другими лекарствами.

В микромолярных концентрациях госсипол способен активировать как внутренние, так и внешние пути апоптоза в раковых клетках различного фенотипа [4]. По механизму действия госсипол относят к ВНЗ-миметикам (домен Bcl-2 homology domain 3), блокирующим взаимодействие между белками Bcl-2/Bcl-xL и Beclin-1 или Вах и вызывающим тем самым апоптоз и аутофа-

гию [5, 6]. Обнаружено, что в микромолярных концентрациях госсипол ингибирует репликацию ДНК, вызывая остановку клеточного цикла в S-фазе [7]. Установлено, что одной из ядерных мишеней госсипола является белок PARP-1, участвующий в репарации и репликации ДНК [8]. Еще одним видом активности госсипола является генотоксичность [9, 10], которая может быть вызвана его непосредственным воздействием на хроматин. В то же время вопрос о том, может ли госсипол напрямую влиять на структуру хроматина, остается открытым.

Нуклеосомы являются функциональной и структурной единицей хроматина и могут быть получены *in vitro* путем прямой сборки из гистонов и ДНК. Они широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях [11–16] и позволяют, в том числе, изучать влияние различных лекарственных соединений на хроматин. При этом микроскопия одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопия) обеспечивает возможность исследования структурных изменений в нуклеосомах при взаимодействиях с белко-

выми факторами и другими биологически активными соединениями [17, 18].

В данной работе представлены результаты изучения воздействия госсипола на структуру хроматина с использованием метода spFRET-микроскопии и флуоресцентно-меченых нуклеосом, имеющих различную структуру в области линкерной ДНК.

Материалы и методы

В работе использовали госсипол фирмы Sigma (США) в виде рацемической смеси (±)-энантиомеров.

Флуоресцентно-меченые ДНК-матрицы длиной 147, 167 и 187 п.н. получали методом полимеразной цепной реакции на основе нуклеосом-позиционирующей последовательности 603 [19] с использованием синтетических олигонуклеотидов-праймеров, меченных флуорофорами Cy3 и Cy5 (Lumiprobe, Россия):

Р-прямой с линкером — 5'-AAGCGACACCG GCACTGGGCCCCGGTTCGCG

C[Cy3-dT]CCCGCCTTCGCGTGTGTTGTCGTTCTCTCGGGCGT-3';

Р-обратный с линкером — 5'-AACCATGATG GGCCTGGGTACCCAGGGACTTGAAGT AA TAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATG CACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3';

М-прямой с линкером — 5'-CAAGCGACACC GGCCTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCGCCTTCCGCGTGTGTTGTCG[Cy5-dT]CTCTC-3';

М-обратный с линкером — 5'-GAACCATGAT GGGCACTGGGTACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCC[Cy3-dT]CTTTC-3';

Р-прямой без линкера — 5'-CCCGGTTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTTCCGCGTGTGTTGTCGTTCTCTCGG-3';

Р-обратный без линкера — 5'-ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATG CACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3';

М-прямой без линкера — 5'-CCCGGTTTCGCGCTCCCGCCTTCGCGTGTGTTGTCG[Cy5-dT]CTCTCGG-3';

М-обратный без линкера — 5'-ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCC[Cy3-dT]CTTTCATCATCGAT-3'.

ДНК-матрицы длиной 147 и 187 п.н. получали, используя соответственно праймеры без линкера и праймеры с линкером. ДНК-матрицу длиной 167 п.н. получали с помощью прямого праймера с линкером и обратного без линкера. Качество полученных ДНК-матриц контролировали электрофоретическим разделением в агарозном геле. ДНК выделяли из геля и очищали, используя набор реактивов Cleanup Standard (Евроген, Россия). ДНК-матрицы содержали метки в положениях 13, 91 п.н. или 35, 113 п.н. от на-

чала нуклеосом-позиционирующей последовательности 603.

Для сборки нуклеосом использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [20]. Нуклеосомы собирали на ДНК-матрицах с помощью ступенчатого диализа против раствора NaCl в уменьшающейся концентрации при 4°C по соответствующему протоколу [21]. Далее мононуклеосомы очищали от избытка донорного хроматина и неспецифических продуктов реакции с помощью препаративного электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле.

Измерения методом spFRET микроскопии выполняли с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия), используя систему детекции на основе лавинных фотодиодов и 40× водно-иммерсионный объектив C-planAprochromat (NA=1,2), как описано ранее [20]. Нуклеосомы (~1 нМ) инкубировали с госсиполом (10–30 мкМ) в течение 20 мин в пробирках с низкой адгезией в буфере TB150 (20 mM Трис-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM β-меркаптоэтанол) и для измерений переносили в силиконовые лунки на покровном стекле. Измеренные интенсивности флуоресценции меток Cy3 и Cy5 в составе одиночных нуклеосом использовали для расчета коэффициента близости E_{PR} , как описано ранее [20]. E_{PR} рассчитывали по формуле:

$$E_{PR} = (I_a - 0,19I_d)/(I_a + 0,81I_d),$$

где I_d и I_a — интенсивности соответственно флуоресценции донора (Cy3) и акцептора (Cy5), а 0,19 и 0,81 — коэффициенты, позволяющие учесть поправку на перекрывание спектров флуоресценции меток в области 635–800 нм. Коэффициент близости E_{PR} — это аналог эффективности FRET без учета поправок на квантовые выходы флуорофоров и отличия в чувствительности прибора в областях испускания флуоресценции Cy3 и Cy5. Выборку значений E_{PR} для всех проанализированных нуклеосом (2000–4000 частиц) представляли в виде частотного распределения нуклеосом по величине E_{PR} (E_{PR} -профиль). E_{PR} -профили описывали в виде линейной суперпозиции двух нормальных (гауссовых) распределений (коэффициент детерминации $R^2 > 0,86$), соответствовавших двум отличающимся по структуре субпопуляциям нуклеосом. Долю субпопуляции нуклеосом с интактной структурой рассчитывали как отношение площади под гауссовым пиком с большими значениями E_{PR} к общей площади под E_{PR} -профилем, усредняли по повторным измерениям и представляли на гистограмме как среднее ± ошибка среднего. Возможность диссоциации нуклеосом при взаимодействии с госсиполом оценивали с помощью «нативного» электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле.

Результаты и их обсуждение

Для изучения взаимодействий госсипола с нуклеосомами использовали три типа нуклеосом: без линкерных участков ДНК, а также с одним или двумя участками линкерной ДНК длиной по 20 п.н. каждый, как схематично изображено на рисунке. Донор-акцепторная пара меток находилась на соседних сверхвитках нуклеосомной ДНК вблизи входа ДНК в нуклеосому (мечение по 13 и 91 п.н.; нуклеосомы P0, P1, P2, где цифра обозначает число участков линкерной ДНК) или в от-

даленной от входа области (мечение по 35 и 112 п.н.; нуклеосомы M0, M1, M2, где цифра — число линкерных участков). Два варианта расположения меток обеспечили возможность анализа структурных изменений в различных участках ДНК кор-нуклеосом. Величину E_{PR} измеряли от одиночных нуклеосом, свободно диффундирующих через фокус лазерного луча [20]. Изменение структуры нуклеосом выявляли, сравнивая E_{PR} -профили до и после инкубации нуклеосом с госсиполом (рисунок).

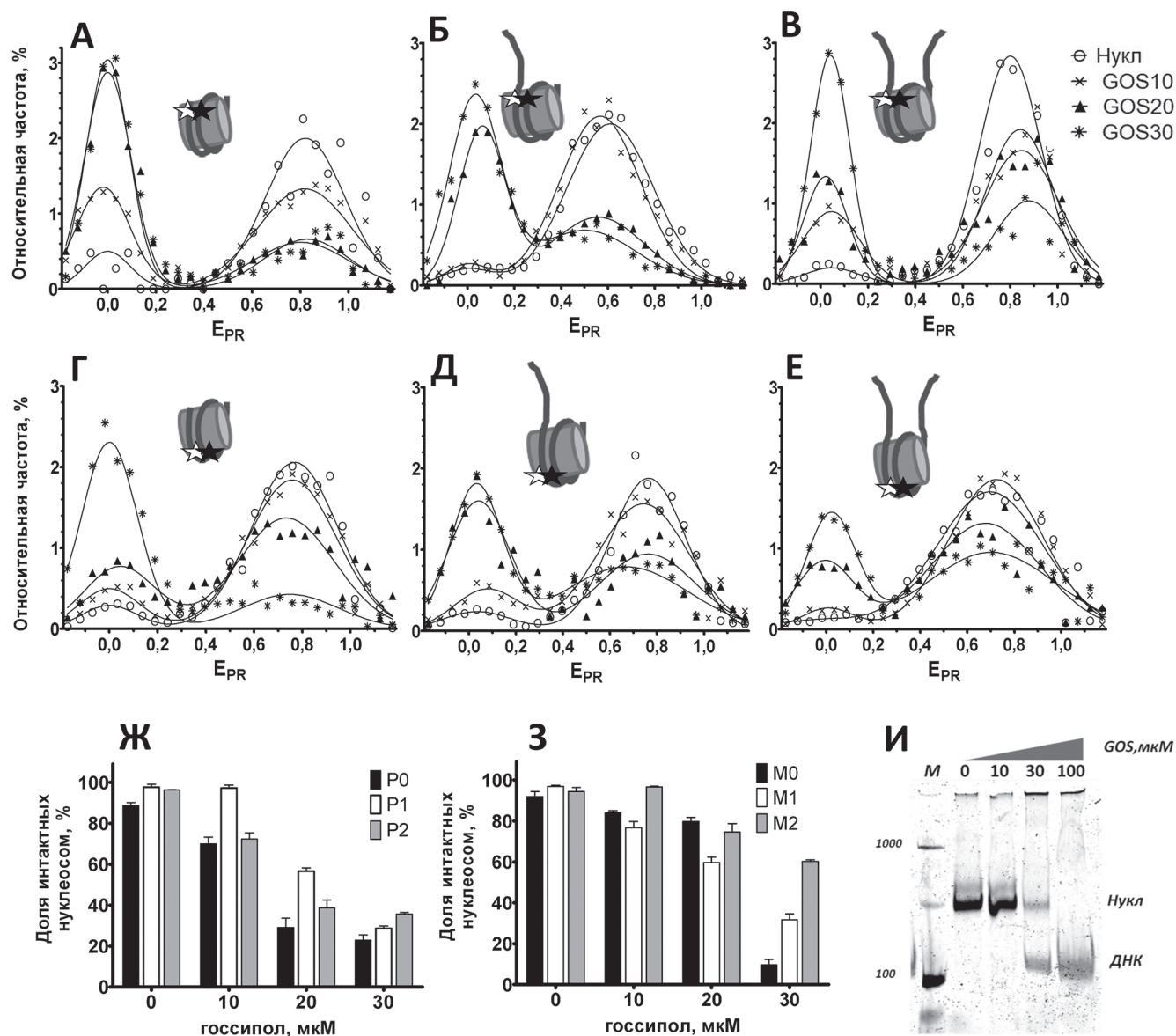


Рисунок. Госсипол влияет на структуру нуклеосом.

(А–Е) Анализ влияния госсипола на структуру нуклеосом с помощью spFRET-микроскопии. Представлены E_{PR} -профили нуклеосом P0 (А), P1 (Б), P2 (В), M0 (Г), M1 (Д) и M2 (Е) в отсутствие госсипола и в присутствии госсипола в концентрации 10 (GOS10), 20 (GOS20) или 30 (GOS30) μM . На вставках схематично показаны положения меток Су3 и Су5 (звездочки) на соседних сверхвитках нуклеосомной ДНК.

(Ж, З) Гистограммы, показывающие долю (%) субпопуляции нуклеосом с высокими значениями E_{PR} при различных концентрациях госсипола для нуклеосом P0, P1 и P2 (Ж), а также M0, M1 и M2 (З).

(И) Электрофореграмма (4%-ный полиакриламидный гель, нативные условия электрофореза, детекция по флуоресценции Су5 в составе ДНК-матрицы) нуклеосом, содержащих один участок линкерной ДНК в отсутствие госсипола и в присутствии госсипола в концентрации 10, 30 или 100 μM . Справа отмечено положение нуклеосом (Нукл) и свободной ДНК-матрицы (ДНК). М — маркерные фрагменты ДНК, указана длина в п.н.

E_{PR} -профили всех типов исследуемых нуклеосом характеризуются интенсивным пиком в области больших значений E_{PR} и минорным пиком в области малых E_{PR} (рисунок, А–Е). Такой тип E_{PR} -профиля соответствует доминированию в растворе субпопуляции нуклеосом с плотной укладкой витков нуклеосомной ДНК на октамере гистонов в области расположения меток, характерной для интактных нуклеосом [12]. Минорный пик отвечает за присутствие в растворе нуклеосом, у которых нарушена укладка ДНК, и свободной ДНК, образующейся при диссоциации нуклеосом. Инкубация нуклеосом с госсиполом приводит к изменению E_{PR} -профилей, что указывает на изменение структуры нуклеосомы в этом комплексе. Изменения в E_{PR} -профилях заключаются в снижении интенсивности пика в области больших значений E_{PR} и увеличении интенсивности пика в области малых E_{PR} (рисунок, А–Е). Эти изменения обнаруживаются при концентрации госсипола 10 мкМ и усиливаются при ее увеличении. Из анализа E_{PR} -профилей P0, P1 и P2 следует, что при 10 мкМ госсипола структурные изменения происходят в области входа ДНК в коровую область в ~30% нуклеосом P0 и P2, то есть независимо от присутствия или отсутствия двух участков линкерной ДНК (рисунок, Ж). Эти изменения слабее затрагивают более удаленные от входа участки нуклеосомной ДНК, о чем свидетельствует увеличение доли нуклеосом M0 с нарушенной в области расположения меток структурой всего на 7% и отсутствие структурных перестроек в области меток в нуклеосомах M2 (рисунок, Г, Е, З). В случае нуклеосом M1 с одним участком линкерной ДНК структурные изменения наблюдались у 20% нуклеосом. Оценка зависимости эффективности FRET от расстояния между метками позволяет заключить, что снижение величины E_{PR} практически до нуля свидетельствует об увеличении расстояния между соседними супервитками ДНК до 9 нм или более в областях 13-й и 91-й, а также 35-й и 112-й п.н. [12].

При 20 мкМ госсипола доля нуклеосом со структурными изменениями, затрагивающими не менее 13 п.н. нуклеосомной ДНК, возрастает до 59, 42 и 55% соответственно у нуклеосом P0, P1 и P2. При этом увеличивается немного и доля нуклеосом с изменениями, затрагивающими не менее 35 п.н. нуклеосомной ДНК. При 30 мкМ госсипо-

ла значительно возрастает доля нуклеосом с изменениями, вовлекающими не менее 35 п.н., но нуклеосомы с двумя линкерными участками (P2, M2) демонстрируют повышенную устойчивость к действию госсипола.

Исследования методом электрофореза в полиакриламидном геле показали, что структурные изменения, обнаруживаемые методом spFRET-микроскопии, при 10 мкМ госсипола не приводят к диссоциации нуклеосом, а при 30 мкМ около 60% нуклеосом диссоциирует с образованием свободной ДНК (рисунок, И). Госсипол в концентрации 100 мкМ полностью разрушает нуклеосомы, вызывая диссоциацию гистонов от ДНК (рисунок, И).

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что при низких концентрациях (10 мкМ) госсипол, связываясь с нуклеосомами, вызывает структурные изменения, приводящие, наиболее вероятно, к откручиванию нуклеосомной ДНК от белкового кора без потери гистонов. Механизм воздействия госсипола на нуклеосомы требует более детального изучения, так как возможное взаимодействие госсипола с гистонами не исследовалось, а о комплексах госсипола с ДНК известно только то, что они образуются [22, 23]. Возможно, связывание госсипола с нуклеосомной ДНК приводит к нарушению взаимодействий между ДНК и коровыми гистонами, что при концентрациях госсипола 30–100 мкМ вызывает концентрационно-зависимую диссоциацию нуклеосом, сопровождающуюся полным освобождением ДНК от коровых гистонов. Полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемая *in vivo* генотоксичность госсипола может быть опосредована прямым воздействием госсипола на хроматин, приводящим к нарушению его структуры.

Отметим, что экспериментальная система на основе флуоресцентно-меченых нуклеосом и метода spFRET-микроскопии является удобным инструментом для изучения воздействия различных биологически активных соединений на структуру хроматина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-54-33045). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tian X., Fang X., Huang J., Wang Q.J., Mao Y.B., Chen X.Y. A gossypol biosynthetic intermediate disturbs plant defence response // *Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2019. Vol. 374. N 1767: 20180319.
2. Jia L., Coward L.C., Kerstner-Wood C.D., Cork R.L., Gorman G.S., Noker P.E., Kitad S., Pellicchia M., Reed J.C. Comparison of pharmacokinetic and metabolic profiling among gossypol, apogossypol and apogossypol-

hexaacetate // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. Vol. 61. N 1. P. 63–73.

3. Benvenuto M., Mattera R., Masuelli L., Taffera G., Andracchio O., Tresoldi I., Lido P., Giganti M. G., Godos J., Modesti A., Bei R. (+/-)-Gossypol induces apoptosis and autophagy in head and neck carcinoma cell lines and inhibits the growth of transplanted salivary gland cancer cells in BALB/c mice // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2017. Vol. 68. N 3. P. 298–312.

4. Lin J., Wu Y., Yang D., Zhao Y. Induction of apoptosis and antitumor effects of a small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xl, gossypol acetate, in multiple myeloma in vitro and in vivo // *Oncol. Rep.* 2013. Vol. 30. N 2. P. 731–738.
5. Meng Y., Tang W., Dai Y., Wu X.M., Liu Ji Q., Ji M., Pienta K., Lawrence T., Xu L. Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa // *Mol. Cancer Ther.* 2008. Vol. 7. N 7. P. 2192–2021.
6. Lian J., Karnak D., Xu L. The Bcl-2-Becclin 1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy versus apoptosis in prostate cancer cells // *Autophagy.* 2010. Vol. 6. N 8. P. 1201–1203.
7. Wang Y., Rao P.N. Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian cells in vitro // *Cancer Res.* 1984. Vol. 44. N 1. P. 35–38.
8. Na Z., Peng B., Ng S., Pan S., Lee J. S., Shen H.M., Yao S.Q. A small-molecule protein-protein interaction inhibitor of PARP1 that targets its BRCT domain // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. Vol. 54. N 8. P. 2515–2519.
9. Rao M.V., Narechania M. B. The genotoxic effects of anti-cancer drug gossypol on human lymphocytes and its mitigation by melatonin // *Drug Chem. Toxicol.* 2016. Vol. 39. N 4. P. 357–361.
10. Luz V.B., Gadelha I.C.N., Cordeiro L.A.V., Melo M.M., Soto-Blanco B. In vitro study of gossypol's ovarian toxicity to rodents and goats // *Toxicol.* 2018. Vol. 145. P. 56–60.
11. Belotserkovskaya R., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration // *Science.* 2003. Vol. 301. N. 5636. P. 1090–1093.
12. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., Mccullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
13. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 3. P. 1619–1627.
14. Nilov D., Maluchenko N., Kurgina T., Pushkarev S., Lys A., Kutuzov M., Gerasimova N., Feofanov, A.V., Svedas V., Lavrik O., Studitsky V.M. Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 6: E2159.
15. Mccullough L.L., Connell Z., Xin H., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Valieva M.E., Formosa T. Functional roles of the DNA-binding HMGB domain in the histone chaperone FACT in nucleosome reorganization // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293. N. 16. P. 6121–6133.
16. Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genet.* 2017. Vol. 4. N. 1. P. 21–31.
17. Chang H.W., Valieva M.E., Safina A., Chereji R.V., Wang J., Kulaeva O. I., Morozov A. V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Gurova K.V., Studitsky V.M. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins // *Sci. Adv.* 2018. Vol. 4. N 11: eaav 2131.
18. Maluchenko N.V., Sultanov D.S., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Histone tails promote PARP1-dependent structural rearrangements in nucleosomes // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. Vol. 489. N 1. P. 377–379.
19. Morozov A.V., Fortney K., Gaykalov, D.A., Studitsky V.M., Widom J., Siggia E.D. Using DNA mechanics to predict *in vitro* nucleosome positions and formation energies // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. N 14. P. 4707–4722.
20. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
21. Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Preparation and analysis of positioned mononucleosomes // *Chromatin protocols. Methods in molecular biology.* Vol. 1288 / Ed.S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2015. P. 15–26.
22. Zaidi R., Hadi S.M. Interaction of gossypol with DNA // *Toxicol. In Vitro.* 1992. Vol. 6. N 1. P. 71–76.
23. Zaidi R., Hadi S.M. Complexes involving gossypol, DNA and Cu(II) // *Biochem. Int.* 1992. Vol. 28. N 6. P. 1135–1143.

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 12.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of gossypol on nucleosome structure

N.V. Malyuchenko^{1,*}, D.O. Koshkina¹, A.N. Korovina¹, N.S. Gerasimova¹, M.P. Kirpichnikov¹, V.M. Studitsky^{1,2}, A.V. Feofanov^{1,3}

¹Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: mal_nat@mail.ru

Gossypol is a highly active compound with antiviral, antioxidant, antimicrobial, antimalarial and antitumor properties. It is known that the antitumor effect of gossypol is associated with genotoxicity, but interaction of gossypol with chromatin was not investigated. In this work,

using microscopy of single particles based on the Förster resonance energy transfer it was found that at 10 M or higher concentration, gossypol causes significant structural changes in the conformation of nucleosomal DNA on the histone octamer. These changes affect at least 35 bp of nucleosomal DNA, increase the distance between neighboring gyres of nucleosomal DNA in this region to 9 nm or more, and appear to be associated with uncoiling of nucleosomal DNA. The presence of linker DNA somewhat increases the resistance of nucleosomes to the gossypol action, as compared with core nucleosomes. At a concentration of 30 μ M or higher, gossypol completely disrupts the structure of nucleosomes, causing dissociation of core histones from DNA. The obtained data indicate that gossypol genotoxicity observed *in vivo* could be associated with a direct effect of gossypol on chromatin, leading to destabilization of the nucleosome structure.

Keywords: *gossypol, nucleosome, chromatin, fluorescence, Förster resonance energy transfer*

Сведения об авторах

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mal_nat@mail.ru

Кошкина Дарья Олеговна — магистр 1 года обучения кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: koshdar@ro.ru

Коровина Анна Николаевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; anna.korovina@gmail.com

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, ассистент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shordome@gmail.com

Кирпичников Михаил Петрович — акад. РАН, проф., докт. биол. наук, декан и зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и отдела эпигенетики рака ракового центра Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 551.465

**Мелкие фототрофные флагелляты Белого моря:
сезонная динамика и роль в планктонных и ледовых сообществах****Е.Р. Никишова¹, И.Г. Радченко¹, Т.А. Белевич^{1,2,*}**¹*Кафедра общей экологии и гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40***e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru*

Численность и биомасса мелких (3–10 мкм) фототрофных флагеллят (МФФ), концентрация хлорофилла «а», а также вклад МФФ в суммарную биомассу фитопланктона на разных этапах сезонного развития во льду и поверхностном слое воды были исследованы в Кандалакшском заливе Белого моря в сентябре 2016 г., а также в феврале и июле 2017 г. Биомасса МФФ в поверхностном слое составила в среднем летом $38,36 \pm 9,77$ мг С/м³, осенью – $2,22 \pm 1,43$ мг С/м³, зимой в подледной воде – $2,6 \pm 1,72$ мг С/м³, во льду – $14,79 \pm 11,25$ мг С/м³. Вклад МФФ в суммарную биомассу фитопланктона колебался в зависимости от сезона от 29% до 95%, вклад в криофлору составил в среднем 66%. Размерная структура МФФ различалась по сезонам. Летом и зимой во льду доминировали флагелляты с размером клетки от 6 до 10 мкм. Осенью и в подледной воде среди МФФ преобладала размерная группа от 3 до 6 мкм. Полученные оценки обилия МФФ обусловили более высокие значения суммарной биомассы фитопланктона Белого моря в осенне-зимний период по сравнению с оценками, полученными ранее. Учет МФФ современным методом эпифлуоресцентной микроскопии подтверждает предположение о том, что основными продуцентами в зимний период, а также летом при низкой биомассе планктонных водорослей размерной фракции более 10 мкм являются МФФ.

Ключевые слова: *мелкие фототрофные флагелляты, сезонная динамика, криофлора, фитопланктон, пикофитопланктон, Кандалакшский залив*

Фототрофные флагелляты – важнейший компонент фитопланктона и ледовой флоры в морских экосистемах, они включают представителей практически всех классов водорослей, за исключением диатомей [1, 2]. Мелкие фототрофные флагелляты (МФФ; 3–10 мкм) часто доминируют в субарктических и арктических морях [2, 3]. Однако оценка обилия мелкоклеточных водорослей требует использования специальных методов, отличающихся от традиционных методов фитопланктонологии, а определение их таксономической принадлежности возможно только на основе молекулярно-генетических методов. Это обусловлено разрушением нежных клеток при фиксации проб, а также трудностями определения мелких клеток под световым микроскопом. Соответственно, при общепринятой обработке проб фитопланктона и льда недоучет обилия МФФ может вести к заниженным оценкам суммарной биомассы водорослей. Несмотря на значимость мелкоклеточных водорослей, сведения о МФФ субарктического Белого моря и морей Российской Арктики крайне скудны.

Целью данной работы являлась оценка численности, биомассы и размерной структуры

МФФ, а также их вклада в суммарную биомассу фитопланктона и криофлоры на разных этапах сезонного развития во льду и в поверхностном слое воды Белого моря.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили пробы воды и льда, отобранные в Кандалакшском заливе Белого моря в районе Беломорской биологической станции (ББС) МГУ им. Н.А. Перцова (66°34' с.ш., 33°08' в.д.). Пробы воды из поверхностного горизонта были отобраны в сентябре 2016 г., а также в феврале (подледный слой) и июле 2017 г. на пяти станциях, расположенных в системе Ругозерская губа – пролив Великая Салма (рис. 1).

Отбор проб производился пластиковым батометром объемом 5 л с борта судна или с пирса ББС (прибрежная станция). Отбор подледной воды производился из лунки, сделанной кольцевым буром. В ходе отбора измеряли температуру и соленость воды (YSI Professional Plus, США).

При количественной обработке проб принимали следующие диапазоны максимального линейного размера водорослей: пикофракция

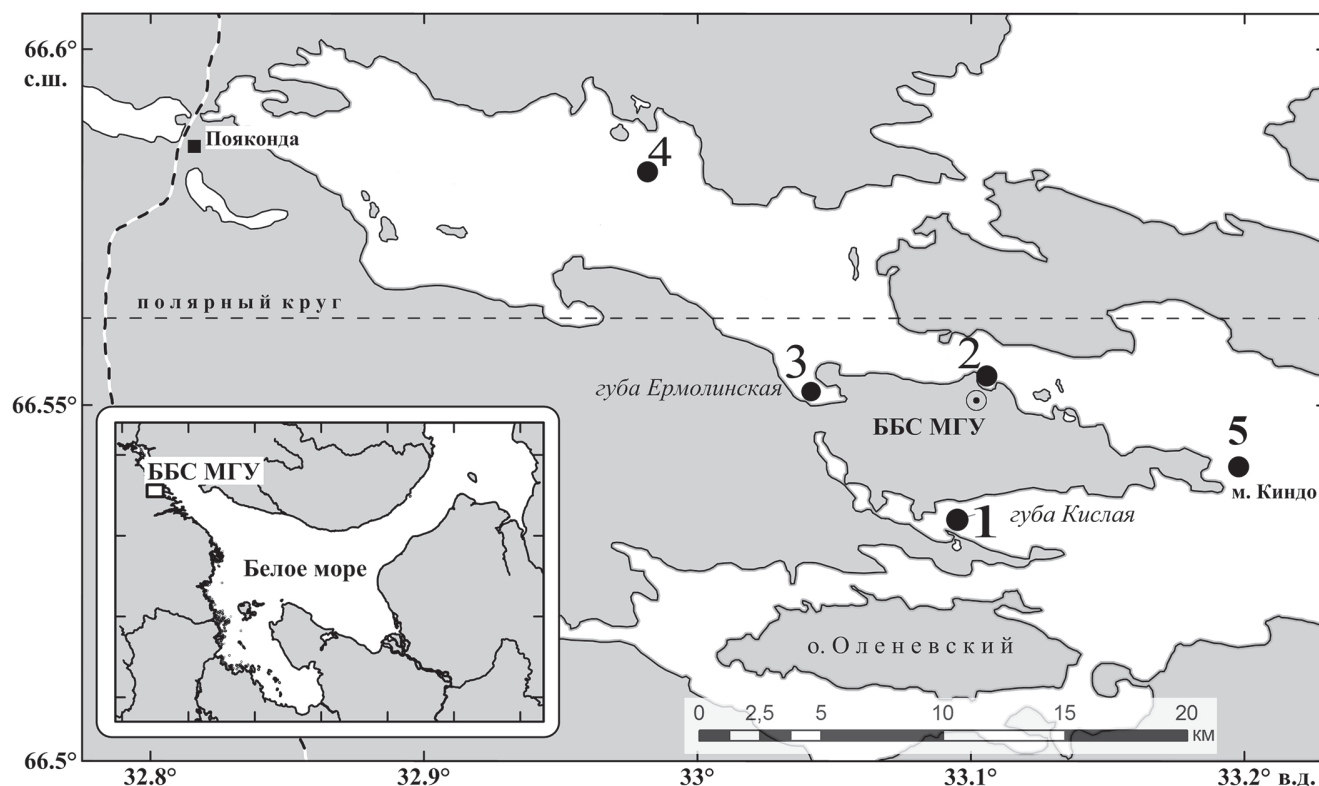


Рис. 1. Схема расположения станций в проливе Великая Салма Кандалакшского залива Белого моря.

(ПФ) – 0,2–3 мкм, МФФ – 3–10 мкм и наномикрофракция (НМФ, 3–200 мкм), исключая представителей МФФ [4, 5].

Для оценки численности ПФ и МФФ использовали метод эпифлуоресцентной микроскопии [6, 7]. Подсчет ПФ проводился согласно методике [8]. Для учета МФФ пробы объемом 20–40 мл непосредственно после отбора окрашивали примулином, фиксировали 3,6%-ным раствором глютарового диальдегида и осаждали на черные ядерные фильтры «Nucleopore» с диаметром пор 0,2 мкм. Препараты просматривали под микроскопом Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 100 \times 10 \times 1,3$ под УФ- (355–425 нм) и зеленым светом (515–560 нм), число просмотренных полей зрения зависело от концентрации клеток и составляло 30–50. При подсчете определяли размеры клеток, а также учитывали тип их свечения: к МФФ относили клетки, светящиеся красным и оранжевым цветом; клетки, не имеющие пигментов, относили к гетеротрофным организмам и не учитывали при дальнейшем анализе. При просмотре проб под микроскопом МФФ разделяли на две размерные группы: РГ1 (≥ 3 – ≤ 6 мкм) и РГ2 (> 6 – ≤ 10 мкм).

Для оценки численности НМФ пробы воды объемом от 1 до 3 л концентрировали методом обратной фильтрации, фиксировали раствором Люголя и просчитывали под световым микроскопом Микромед 3 (Микромед, Россия-Китай) в камере Ножотта объемом 0,05 мл при увеличении

$\times 40 \times 10 \times 0,65$. Учитывали только фотосинтезирующие клетки по наличию хроматофоров. Линейные размеры клеток измеряли окуляр-микрометром.

Биомассу клеток рассчитывали, исходя из объема соответствующих стереометрических фигур [9]. Клеточное содержание углерода рассчитывали по объемам клеток с использованием аллометрических зависимостей и учетом систематической принадлежности водорослей [10].

Для определения концентрации хлорофилла «а» (ХЛ) пробы воды объемом 0,5–1 л фильтровали через фильтры GF/F. Концентрацию ХЛ определяли флуориметрически в ацетоновом экстракте [11], используя флуориметр Trilogy (Turner Designs, США).

Для оценки обилия криофлоры пробы льда отбирали на трех станциях (станции 1, 3 и 4) с помощью бура с диаметром режущего кольца 14 см. Каждый керн льда делили на части и растапливали в лаборатории при температуре 3–5°C с добавлением стерильной морской воды с целью минимизировать разрушение клеток нежных жгутиковых форм в результате осмотического шока. Последующая обработка проб талой воды проводилась согласно вышеизложенной методике.

Достоверность различий средних значений параметров оценивали по критерию Манна-Уитни. Для оценки зависимости между параметрами рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (R_s). Расчеты проводили с применением программного пакета анализа данных PAST [12].

Результаты

Абиотические условия. Средние значения температуры и солености воды составили летом 11,6°С и 23,1‰, осенью – 10,1°С и 24,3‰, зимой – (-1,2°С) и 27,5‰ соответственно (табл. 1). Из-за аномально теплой зимы в феврале 2017 г. только районы станций 1, 3 и 4 были покрыты льдом на акватории Ругозерской губы и пролива Великая Салма. Толщина льда колебалась в диапазоне от 23 до 40 см (табл. 2). Согласно визуальной различимой структуре, в отобранных кернах льда выделено несколько слоев: верхний белесый рыхлый слой снежного генезиса, средний матовый кристаллический слой водного генезиса и нижний пористый слой. Температура и соленость льда варьировали в разных частях кернов, составляя в среднем -2,4°С и 6,4‰ соответственно (табл. 1, 2).

Состав и биомасса наномикрофитопланктона, пикофитопланктона и концентрация хлорофилла «а». НМФ был представлен эукариотическими водорослями, относящимися к 70 таксонам разного ранга. Наибольшим видовым богатством характеризовались диатомовые (55 таксонов) и динофитовые водоросли (5 таксонов). Также присутствовали эвгленовые, криптофитовые и диктиохофициевые водоросли, отмечена *Ebria tripartita* (J. Schumann) Lemmermann – водоросль неясного таксономического положения. Летом в фитопланктоне доминировали динофлагелляты рода *Ceratium* F. Schrank, их вклад в биомассу наномикрофитопланктона ($V_{НМФ}$) на разных станциях колебался от 22% до 54%. Осенью фитопланктон был в основном представлен комплексом, состоящим из динофитовых водорослей рода *Ceratuim* и мелкой диатомеи

Cyclotella choctawhatcheeana Prasad, вклад каждого из доминирующих таксонов в $V_{НМФ}$ составил в среднем по 27%. Зимой в подледной воде преобладали диатомовые водоросли родов *Navicula* Bory и *Thalassiosira* Cleve, давая в $V_{НМФ}$ в среднем 27% и 20% соответственно. ПФ был представлен цианобактериями и эукариотными водорослями. Во все сезоны в ПФ доминировали цианобактерии, их вклад в суммарную биомассу ПФ ($V_{ПФ}$) колебался от 62% (лето) до 76% (осень). Биомасса НМФ была относительно невысокой, наибольшие значения отмечены сентябре, минимальные – в феврале (табл. 1). Такая же тенденция характерна и для ПФ – максимальная биомасса ПФ выявлена осенью, минимальная – в подледной воде. Средние значения концентрации ХЛ летом и осенью практически не различались, зимой содержание ХЛ в подледной воде было минимальным (табл. 1).

Численность, биомасса, размерная структура и вклад МФФ в суммарную биомассу планктонных фотосинтезирующих водорослей. Параметры обилия МФФ существенно варьировали по сезонам (табл. 1). Летом численность и биомасса МФФ были достоверно выше, чем осенью и зимой в подледной воде ($p<0,001$). Зимой и осенью значения численности и биомассы МФФ достоверно не различались. Вклад МФФ в суммарную биомассу фитопланктона ($V_{сум}$) во все исследованные периоды был высоким и варьировал от 29% осенью до 95% летом (табл. 1). Размерная структура фотосинтезирующих жгутиковых различалась по сезонам (рис. 2). Летом в составе МФФ доминировали представители РГ2, биомасса которых колебалась от 12,60 до 39,12 мг С/м³, составляя в

Таблица 1

Пределы изменения температуры (Т, °С), солености (S, ‰), средние значения (± стандартное отклонение) содержания хлорофилла «а» (ХЛ, мг/м³), биомассы микро- и наномикрофитопланктона ($V_{НМФ}$, мг С/м³), пикофитопланктона ($V_{ПФ}$, мг С/м³), численности МФФ ($N_{МФФ}$, ·10⁹ клеток/м³), биомассы МФФ ($V_{МФФ}$, мг С/м³), суммарной биомассы фотосинтетического планктона ($V_{сум}$, мг С/м³), вклад биомассы МФФ в суммарную биомассу фитопланктона (вклад, %) в разные сезоны в Белом море.

Сезон	Т	S	ХЛ	$V_{НМФ}$	$V_{ПФ}$	$N_{МФФ}$	$V_{МФФ}$	$V_{сум}$	Вклад
Лето	10,1–13,3	22,4–23,4	0,76±0,5	1,26±0,65	0,91±0,42	0,84±0,26	38,36±9,77	40,35±9,54	95
Осень	9,7–10,9	23,9–24,5	0,81±0,21	2,14±1,52	3,41±1,31	0,18±0,13	2,22±1,43	7,77±2,81	29
Зима, вода	-1,4–1,1	26,5–28,5	0,03±0,01	0,11±0,03	0,18±0,03	0,13±0,06	2,6±1,72	2,88±1,72	90
Зима, лед	-3,4–(-1,7)	3,4–9,3	0,50±0,14	7,28±3,77	0,42±0,07	0,61±0,45	14,79±11,25	22,48±8,82	66

Таблица 2

Высота слоев (Н, см), температура (Т, °С) и соленость (S, ‰) льда, численность МФФ ($N_{МФФ}$, ·10⁹ клеток/м³), биомасса МФФ ($V_{МФФ}$, мг С/м³), биомасса РГ1 ($V_{РГ1}$, мг С/м³) и РГ2 ($V_{РГ2}$, мг С/м³), биомасса пикофракции водорослей льда ($V_{ПФ}$, мг С/м³) и биомасса наномикрофракции криптофлоры ($V_{НМФ}$, мг С/м³) в исследуемых кернах.

Станции	Н	Т	S	$N_{МФФ}$	$V_{МФФ}$	$V_{РГ1}$	$V_{РГ2}$	$V_{ПФ}$	$V_{НМФ}$
1	0–5	-2,6	7,3	0,06	1,58	0,45	1,13	0,31	1,17
	5–22	-2,1	н.д.	0,65	29,85	2,91	26,94	0,50	4,13
	22–23	-1,7	9,3	0,21	7,84	2,06	5,78	0,55	6,74
3	0–2	-3,4	7,2	0,22	12,57	1,93	10,64	0,39	3,62
	2–31	-3,2	4,9	0,18	8,33	1,38	6,94	0,4	14,89
	31–40	-1,7	4,3	0,12	4,71	0,93	3,77	0,2	2,00
4	0–4	-2,3	8,5	0,13	1,72	1,10	0,62	0,15	2,72
	4–25	-2,2	н.д.	0,20	10,59	1,47	9,13	0,47	3,69
	25–29	-1,7	3,4	0,12	3,40	0,98	2,42	0,14	26,37

Примечание: н.д. – нет данных.

среднем $30,51 \pm 12,84$ мг С/м³. Вклад РГ2 составлял 80% общей биомассы МФФ (рис. 2). Осенью и зимой в подледной воде в составе планктонных МФФ преобладала группа РГ1, средние значения биомассы этой размерной группы составили $1,66 \pm 1,18$ и $1,55 \pm 0,84$ мг С/м³ соответственно, их доля в общей биомассе ММФ достигала 75% и 60% (рис. 2). При сопоставлении концентрации ХЛ и вклада МФФ в $V_{\text{сум}}$ была выявлена умеренная достоверная обратная зависимость ($r = -0,32$; $p = 0,05$).

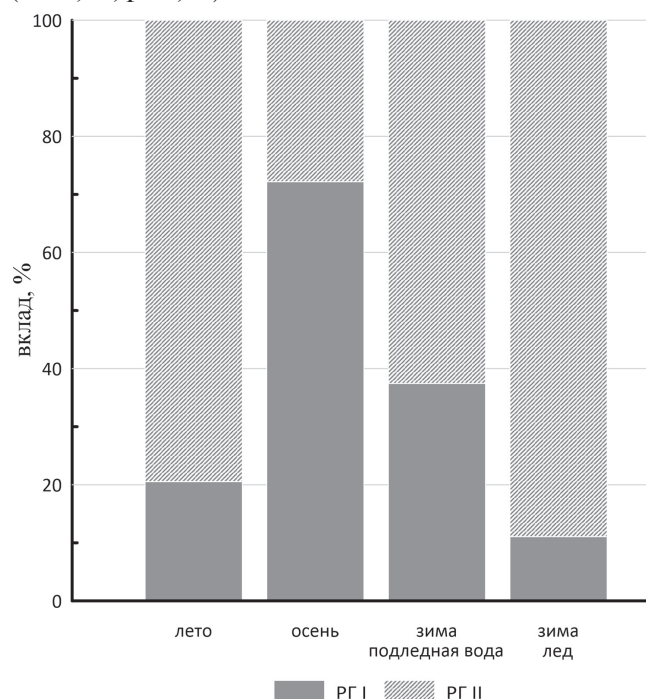


Рис. 2. Вклад размерной группы от 3 до 6 мкм (РГ I) и размерной группы от 6 до 10 мкм (РГ II) в общую биомассу ММФ планктона и льда Белого моря.

Численность, биомасса, размерная структура ММФ в ледовых сообществах и их вклад в фототрофную криофлору. В составе НМФ криофлоры во всей толще льда доминировала диатомовая водоросль *Entomoneis kjellmanii* (Cleve) Poulin & Cardinal, ее вклад в $V_{\text{НМФ}}$ колебался от 31% до 85%. Исключение составил верхний слой льда на станции 1, где доля эвгленовых водорослей достигала 51%. Максимальное обилие водорослей НМФ было выявлено в нижнем пористом слое льда (станции 1 и 4) или в среднем кристаллическом слое водного генезиса (станция 3). В пикофракции доминировали цианобактерии, наибольшие значения $V_{\text{ПФ}}$ также отмечены в среднем или нижнем слоях льда (табл. 2). Содержание ХЛ во льду было на порядок выше, чем в подледной воде (табл. 1). Численность и биомасса ММФ были распределены неравномерно в толще льда (табл. 2). Максимальные значения $V_{\text{МФФ}}$ отмечены в среднем кристаллическом слое водного генезиса (станции 1 и 4) или в верхнем рыхлом слое снежного генезиса (станция 3). Практически во

всех слоях по численности и биомассе доминировали флагелляты РГ2, их вклад в $V_{\text{МФФ}}$ колебался от 84% до 90%. Вклад ММФ в суммарную биомассу фотосинтетической криофлоры варьировал от 40 до 86%, составляя в среднем 66%.

Обсуждение результатов

В настоящей работе впервые для Белого моря на разных стадиях сезонного развития планктона оценены численность и биомасса мелких фотосинтезирующих жгутиковых водорослей с размерами клетки от 3 до 10 мкм. Вследствие малых размеров и разрушения нежных форм при фиксации эта размерная фракция обычно недоучитывается при традиционных методах количественной обработки проб фитопланктона. Использование метода эпифлуоресцентной микроскопии позволило впервые дать адекватную оценку обилия ММФ. Сопоставление полученных нами данных по акватории Ругозерская губа – пролив Великая Салма с имеющимися данными по планктону Белого моря показало следующее. Обилие ММФ во льду и в подледной воде в феврале, в период наших исследований, оказалось несколько меньше численности фотосинтезирующих жгутиковых, включая пико- и наноформы, в губе Чупа Кандакшского залива в апреле 2002 г. [13]. Полученные нами более низкие оценки численности ММФ связаны с тем, что исследования 2002 г. охватывали большее количество размерных фракций фотосинтезирующих флагеллят и проводились уже в весенний период, когда световые условия более благоприятны для фотосинтеза и роста водорослей, а во льду отмечается их цветение [14]. Это позволяет полагать, что в системе Ругозерская губа – пролив Великая Салма численность ММФ в апреле также возрастает. В июле–августе 2009–2010 гг. в проливе Великая Салма биомасса нанофлагеллят (3–20 мкм) была ниже [8] полученных нами оценок только для ММФ. Следует отметить, что суммарная биомасса микропланктонных диатомовых и динофитовых водорослей летом 2009 и 2010 гг. была, наоборот, выше, чем в период наших исследований в 2017 г. В целом, между концентрацией ХЛ и вкладом ММФ в суммарную биомассу была выявлена достоверная обратная зависимость. Это означает, что чем больше биомасса фотосинтезирующего фитопланктона (в единицах хлорофилла «а»), тем меньше вклад ММФ в суммарную биомассу. Мы предполагаем, что более низкое обилие НМФ в июле 2017 г. может быть обусловлено общей тенденцией в последние годы уменьшения доли крупных форм в фитопланктоне [2, 3, 15]. В связи с потеплением климата наблюдается увеличение стратификации водной толщи и уменьшение биогенных элементов в поверхностном слое в летний период [16]. В этих условиях преимущество получают мелкие формы с высоким отношением пло-

щади поверхности к объему клетки [17]. Кроме того, не следует исключать возможного увеличения численности мезозoopланктона и, соответственно, большого пресса выедания НМФ в данный период. В целом, значения численности и биомассы МФФ (3–10 мкм) попадают в пределы варьирования обилия всех фотосинтезирующих нанопланктонных (3–20 мкм) флагеллят в арктических водах [18, 19], а в некоторых случаях даже превышают их [20–23]. Во льду наибольший вклад МФФ в суммарную биомассу ледовой флоры соответствовал вкладу всех нанофлагеллят в суммарную биомассу криофлоры в феврале в эстуарии реки Св. Лоуренса, Канада [24].

Полученные нами оценки обилия МФФ обусловили более высокие значения суммарной биомассы фитопланктона Белого моря в осенне-зимний период по сравнению с оценками, полученными ранее традиционными методами [25, 26]. Ранее опубликованные данные свиде-

тельствовали о крайне низкой биомассе подледного фитопланктона в январе-феврале [14], в то время как полученные нами значения на два порядка выше.

Учет МФФ современным методом эпифлуоресцентной микроскопии подтвердил наше предположение о том, что основными продуцентами в зимний период являются фотоавтотрофные нанофлагелляты. Более того, нами показано, что даже летом при низкой биомассе микропланктонных диатомей и динофлагеллят МФФ дают основной вклад в суммарную биомассу фитопланктона.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова часть 2 (тема №АААА–А16–116021660052–0).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hernandez-Ruiz M., Barber-Lluch E., Prieto A., Alvarez-Salgado X.A., Logares R., Teira E. Seasonal succession of small planktonic eukaryotes inhabiting surface waters of a coastal upwelling system // *Env. Microb.* 2018. Vol. 20. N 8. P. 2955–2973.
2. Crawford D.W., Cefarelli A.O., Wrohan I.A., Wyatt S.N., Varela D.E. Spatial patterns in abundance, taxonomic composition and carbon biomass of nano- and microphytoplankton in Subarctic and Arctic Seas // *Prog. Oceanogr.* 2018. Vol. 162. P. 132–159.
3. Kubiszyn, A.M., Wiktor, J.M., Wiktor J.M.Jr., Griffiths C., Kristiansen S., Gabrielsen T.M. The annual planktonic protist community structure in an ice-free high Arctic fjord (Adventfjorden, West Spitsbergen) // *J. Mar. Syst.* 2017. Vol. 169. P. 61–72.
4. Sieburth J.M., Smetacek V., Lenz J. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationships to plankton size fractions // *Limnol. Oceanogr.* 1978. Vol. 23. N 6. P. 1256–1263.
5. Moon-van der Staay S.Y., De Wachter R., Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity // *Nature*. 2001. Vol. 409. N 6820. P. 607–610.
6. Caron D.A. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. Vol. 46. N 2. P. 491–498.
7. Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* 1977. Vol. 33. N 5. P. 1225–1228.
8. Belevich T.A., Ilyash L.V. Picophytoplankton abundance in the Velikaya Salma strait, White Sea // *Microbiology*. 2012. Vol. 81. N 3. P. 360–366.
9. Hillebrand H., Durselen C.D., Kirschtel D., Pollinger U., Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae // *J. Phycol.* 1999. Vol. 35. N 2. P. 403–424.
10. Menden-Deuer S., Lessard E.J. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton // *Limnol. Oceanogr.* 2000 Vol. 45. N 3. P. 569–579.
11. Arar E.J., Collins G.B. Method 445.0: In vitro determination of chlorophyll a and pheophytin a in marine and freshwater algae by fluorescence. Cincinnati: United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory, 1997. 22 pp.
12. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis // *Palaeontol. Electron.* 2001. Vol. 4. N 1: 4.
13. Sazhin A. Phototrophic and heterotrophic nano- and microorganisms of sea ice and sub-ice water in Guba Chupa (Chupa Inlet), White Sea, in April 2002 // *Polar Research*. 2004. Vol. 23. N 1. P. 11–18.
14. Ильяш Л.В., Житина Л.С., Кудрявцева В.А., Мельников И.А. Сезонная динамика видового состава и биомассы водорослей в прибрежных льдах Канда-лакшского залива Белого моря // *Журн. общ. биол.* 2012. Т. 73. № 6. С. 461–472.
15. Bolaños L.M., Karp-Boss L., Choi C.J., et al. Small phytoplankton dominate western North Atlantic biomass // *ISME J.* 2020. Vol. 14. P. 1663–1674.
16. Wassmann P. Arctic marine ecosystems in an era of rapid climate change // *Prog. Oceanogr.* 2011. Vol. 90. N 1. P. 1–17.
17. Coello-Camba A., Agustí S., Vaqué D., Holding J., Arrieta J.M., Wassmann P., Duarte C.M. Experimental assessment of temperature thresholds for Arctic phytoplankton communities // *Estuar. Coasts*. 2015. Vol. 38. N 3. P. 873–885.
18. Sherr E.B., Wheeler P.A., Thompson K. Temporal and spatial variation in stocks of autotrophic and heterotrophic microbes in the upper water column of the central Arctic Ocean // *Deep Sea Res. Pt. I: Oceanogr. Res. Pap.* 2003. Vol. 50. N 5. P. 557–571.
19. Vaqué D., Guadayol O., Peters F., Felipe J., Angel-Ripoll L., Terrado R., Lovejoy C., Pedrós-Alioó C. Seasonal changes in planktonic bacterivory rates under the ice-covered coastal Arctic Ocean // *Limnol. Oceanogr.* 2008. Vol. 53. N 6. P. 2427–2438.

20. Mostajir B., Gosselin M., Gratton Y., Booth B., Vasseur C., Garneau M.È., Fouillard É., Vidussi F., Demers S. Surface water distribution of pico- and nanophytoplankton in relation to two distinctive water masses in the North Water, northern Baffin Bay, during fall // *Aquat. Microb. Ecol.* 2001. Vol. 23. N 2. P. 205–212.
21. Waleron M., Waleron K., Vincent W.F., Wilmotte A. Allochthonous inputs of riverine picocyanobacteria to coastal waters in the Arctic Ocean // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. Vol. 59. N 2. P. 356–365.
22. Sanders R.W., Gast R.J. Bacterivory by phototrophic picoplankton and nanoplankton in Arctic waters // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012. Vol. 82. N 2. P. 242–253.
23. Gradinger R. Occurrence of an algal bloom under Arctic pack ice // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1996. Vol. 131. P. 301–305.
24. Demers S., Therriault J.C., Descolas-Gros C. Biomasse et composition spécifique de la microflore des glaces saisonnières: influences de la lumière et de la vitesse de congélation // *Mar. Biol.* 1984. Vol. 78. N 2. P. 185–191.
25. Сарухан-Бек К.К., Радченко И.Г., Кольцова Т.И. Фитопланктон губы Чупа (Кандалакшский залив Белого моря) // Исследования фитопланктона в системе мониторинга Балтийского моря и других морей СССР / Под ред. И. Я. Агаровой, Е. Ю. Гупало. М.: Гидрометеиздат, 1990. С. 111–119.
26. Ильин Л.В., Ратькова Т.Н., Радченко И.Г., Житина Л.С. Фитопланктон Белого моря // Система Белого моря. Т. II. Водная толща и взаимодействующие с ней атмосфера, криосфера, речной сток и биосфера / Под ред. А.П. Лисицына. М.: Научный мир, 2012. С. 605–639.

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

После доработки 27.06.2020 г.

Принята в печать 07.07.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Small photosynthetic flagellates of the White Sea: seasonal dynamics and role in plankton and ice communities

E.R. Nikishova¹, I.G. Radchenko¹, T.A. Belevich^{1,2,*}

¹Department of General Ecology and Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–40, Moscow, Russia

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

Abundance and biomass of small photosynthetic flagellates (SPF; 3–10 µm), chlorophyll *a*, and the contribution of SPF to total phytoplankton biomass in different stages of seasonal succession in ice and the surface water were studied in Kandalaksha Bay of the White Sea in September 2016, February and July 2017. In summer SPF biomass in the photic layer averaged 38.36±9.77 mg C/m³, in autumn – 2.22±1.43 mg C/m³, in under-ice water – 2.6±1.72 mg C/m³, and in ice – 14.79±11.25 mg C/m³. The contribution of SPF to total phytoplankton biomass depends of the season and ranged from 29% to 95%, the contribution to sympagic communities averaged 66%. The size structure of photosynthetic flagellates varied by seasons. Flagellates with cell size 6–10 µm dominated in summer plankton and in the ice. Flagellates with cell size 3–6 µm prevailed in autumn and in the under-ice water. The obtained data of SPF abundance gave higher values of the total phytoplankton biomass of the White Sea in the autumn-winter period compared with the estimates obtained previously. Applying the method of epifluorescence microscopy confirms the assumption that photosynthetic flagellates are the main producers in the winter period, as well as in the summer when the biomass of planktonic algae with cell size more than 10 µm is low.

Keywords: small flagellates, season dynamic, cryoflora, phytoplankton, picophytoplankton, Kandalaksha Bay

Сведения об авторах

Никишова Екатерина Романовна – аспирант кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: katenq@list.ru

Радченко Ирина Георгиевна – канд. биол. наук, доц. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: iraradchenko@yandex.ru

Белевич Татьяна Алексеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК: 582.28:574.5

Состав и структура сообществ мицелиальных грибов в донных грунтах Белого моря

Е.Н. Бубнова^{1,*}, О.А. Грум-Гржимайло¹, В.В. Козловский²¹Беломорская биологическая станция имени Н.А. Перцова, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Центр морских исследований, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 77, Научный парк МГУ, офис 402

*e-mail: kattya.bubnova@wsbs-msu.ru

50 образцов донных грунтов были отобраны в 2016–2017 гг. в Кандалакшском заливе Белого моря с глубин 1,5–15 м. Выделено 1419 колоний мицелиальных грибов, отнесенных к 136 морфотипам, из которых 81 был идентифицирован до вида по морфолого-культуральным признакам. Обнаружено 13 видов, новых для Белого моря. Наиболее распространенными были *Tolypocladium cylindrosporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Tolypocladium inflatum*, *Penicillium glabrum* и анаморфа *Pseudogymnoascus pannorum*. В таксономической структуре преобладали анаморфы аскомицетов, а самой многочисленной и разнообразной группой был класс Sordariomycetes. Оценка видового богатства с помощью кумулятивной кривой и расчета ожидаемого полного числа видов с поправкой Chao2 показала, что видовое разнообразие выявлено примерно на 81%. Ординация сообществ грибов методом nMDS с тестом ANOSIM показала высокую значимость объединения групп по признакам года отбора и типа грунта, а также года отбора и типа экотопа. Таким образом, важнейшим фактором для формирования микобиоты является тип грунта, связанный с типом берега и наличием пресного стока. Кроме того, сообщества мицелиальных грибов в исследованных донных грунтах меняются год от года.

Ключевые слова: морские грибы, Ascomycota, донные грунты, разнообразие, Белое море, ординация сообществ

Донные осадки океана — одно из самых больших по охвату территории местообитаний на Земле [1]. Вместе с тем, до последнего времени они практически не привлекали внимание морских микологов. Долго считалось, что здесь могут находиться только покоящиеся propagules грибов, принесенные с суши и не участвующие в функционировании экосистемы [2]. Но в последние 20 лет ситуация стала меняться, появляется все больше исследований микобиоты этих местообитаний. Основное внимание пока сосредоточено на исследовании разнообразия грибов в донных грунтах различных широт [3–6] и глубин [7–10], а также на изучении отдельных особенностей выделенных культур [11, 12]. Этими работами продемонстрировано, что морские грунты — местообитание, богатое грибами, а их видовое разнообразие зачастую очень высоко. Это относится как к прибрежным [3, 8–11], так и к удаленным от берега [4, 7, 12] районам. В настоящее время исследования разнообразия грибов в донных осадках мирового океана и их приспособлений к условиям среды — актуальные направления морской микологии [11, 12]. Несмотря на растущий интерес, микобиота морских грунтов исследована пока крайне фрагментарно. Кроме того, в большинстве случаев ученые имеют

в своем распоряжении малое количество образцов и не проводят статистической обработки результатов. Поэтому основной целью своей работы мы поставили выявление и оценку видового разнообразия сообщества мицелиальных грибов небольшого участка акватории и изучение влияния некоторых параметров на ее формирование с использованием большого числа образцов и применением статистических методов.

Материалы и методы

Отбор образцов. Материал для исследования — 50 образцов грунтов сублиторали — отбирали в конце июля—начале августа 2016 (29 образцов) и 2017 (21 образец) гг. в Кандалакшском заливе Белого моря, в окрестностях Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова (ББС), в 13 прибрежных локациях (по 2–4 образца в каждой) с глубин от 1,5 до 15 м. Материал отбирали из верхнего слоя (2 см) грунта стерильными пластиковыми пробирками, по одной из каждой точки, в основном при водолазных погружениях. В одной локации — Ермолинской губе (5 образцов, 2016) — грунт поднимали с помощью дночерпателя, из которого материал собирали в пробирки. Крайние локации (Ермолинская губа и мыс Киндо) распо-

лагались на расстоянии примерно 7 км друг от друга. Большинство локаций расположены на небольшом участке (1,5×0,5 км) в проливе Великая Салма около ББС.

Выделение и идентификация грибов. Видовой состав грибов выявляли общепринятыми морфолого-культуральными методами [3, 5, 7–9, 12]. Образцы высевали непосредственно в день отбора (или на следующий) на поверхность среды сусло-агар на природной морской воде (общее содержание сахаров – 0,3%, соленость – 26‰, антибиотик Цефтриаксон – 0,5 г/л). До посева материал хранили при +6°C. Перед посевом из пробирки сливали излишек воды, из образца брали 1 см³ и равномерно распределяли простерилизованным шпателем по 5 чашкам со средой. Инкубировали при +6°C в течение 6 нед., после чего выделяли образовавшиеся колонии в чистую культуру. Выделенные культуры идентифицировали по возможности до вида. Если это было невозможно, то такие колонии регистрировали как отдельные морфотипы (некоторые морфотипы были представлены несколькими колониями). Названия и таксономическое положение грибов уточняли с помощью базы www.indexfungorum.org/Names/fungic.asp.

Статистическая обработка. На каждой чашке подсчитывали общее число колоний и число колоний каждого вида и морфотипа. Из этих данных вычисляли общее число колоний и число колоний каждого вида и морфотипа в отдельных образцах. Для определения актуального видового разнообразия и выравнивания рассчитывали индексы Шеннона и Пиелу. Оценку видового богатства проводили с использованием кумулятивной кривой накопления числа видов при увеличении числа образцов. Т.к. полученная кривая не вышла на плато (увеличение числа проб приводило к увеличению числа видов), то провели расчет ожидаемого полного числа видов с поправкой Chao2 на встречаемость редких видов [13]. Анализ степени сходства сообществ грибов отдельных проб осуществляли на основе расчета индекса сходства Брэя-Кертиса и индекса сходства Сьеренсена. На основании полученных матриц сходства проводили ординацию образцов методом неметрического многомерного шкалирования (nMDS) для выявления общих тенденций в распределении сообществ. Результаты ординации проверяли и дополняли методом однофакторного анализа сходства (ANOSIM), который позволяет оценивать достоверность объединения образцов в те или иные группы [13, 14]. Пороговый уровень значимости, за которым группировка считалась случайной, принимали равным 5%. Были проверены объединения образцов в следующие группы: 1) год отбора (2016/2017); 2) тип осадка (слабозаиленный/сильнозаиленный); 3) глубина (менее 5 м/5–10 м/более 10 м); 4) тип экотопа (открытый берег, без

пресного стока/открытый берег с пресным стоком/полузакрытая бухта с пресным стоком/закрытая губа с пресным стоком); 5) год + тип осадка; 6) год + тип экотопа. Оценка вклада отдельных видов во внутригрупповое сходство и выявление индикаторных (определяющих для объединения образцов в группы) видов проводилась с помощью процедуры SIMPER. Для всех расчетов использовали пакеты MS Excel 2007 (Microsoft™) и PRIMER v6 (Primer™, 2001).

Результаты и обсуждение

Общие сведения о численности и разнообразии микобиоты. Всего во всех посевах выросло 1419 колоний мицелиальных грибов (табл. 1). Из 1 см³ одного образца выделялось от 7 до 74, в большинстве случаев – 20–50 колоний. Данная численность сравнительно невелика. Она немного ниже численности грибов в илистых грунтах на глубинах 54–108 м пролива Великая Салма [5] и на 1–2 порядка ниже численности, полученной А. Хуснуллиной с соавторами [10] из галечно-илисто-песчаных грунтов на глубинах 0–30 м здесь же. Последнее можно связать, предположительно, с разными методологическими подходами. Относительно низкую численность пропагул грибов, полученную нами, можно также связать с типом грунта: большинство исследованных образцов имели песчаный слабозаиленный грунт, а в нем, как правило, численность грибов несколько ниже, чем в более илистых грунтах [15].

Таблица 1

Таксономическая структура микобиоты донных грунтов пролива Великая Салма в Белом море

Класс	Количество					
	порядков	семейств	родов	морфотипов	изолятов	образцов
ZYGOMYCOTA						
Mortierellomycetes	1	1	1	2	2	2
Mucoromycetes	1	2	2	2	5	5
Incertae sedis	1	1	1	2	12	5
ASCOMYCOTA						
Dothideomycetes	3	5	7	8	89	30
Eurotiomycetes	2	2	4	23	405	48
Leotiomycetes	2	2	3	4	124	39
Saccharomycetes	1	1	1	1	1	1
Sordariomycetes	4	11	20	52	648	50
НЕИЗВЕСТНЫЕ (СТЕРИЛЬНЫЕ)						
	-	-	-	43	133	43
ВСЕГО						
	15	25	39	137	1419	50

При относительно низкой численности, разнообразии микобиоты исследованных грунтов высоко. На основе морфолого-культуральных признаков мы выделили 136 морфотипов, из которых 81 был идентифицирован до уровня вида, 14 – до уровня рода, и 43 не были идентифицированы, так как были стерильными. Из одного образца выде-

лялось от 6 до 24 морфотипов, в большинстве случаев — 10–20. Мы обнаружили ряд видов, которые не были ранее известны для Белого моря [10, 15, 16]. Это один вид зигомицетов — *Mortierella hyalina* (Harz) W. Gams и 12 видов из 11 родов анаморф аскомицетов: *Acremonium alternatum* Link; *Aspergillus ochraceus* G. Wilh.; *Cephalotrichum purpureofusum* (S. Hughes) S. Hughes; *Dendryphion nanum* (Nees) S. Hughes; *Exophiala jeanselmei* (Langeron) Mc Ginnis & A.A. Padhye; *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin; *Microascus brevicaulis* S.P. Abbott; *Microascus chartarum* (G. Sm.) Sandoval-Denis, Gené & Guarro; *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard & Crous; *Penicillium griseolum* G. Sm.; *Tolypocladium microsporum* (Jaap) Bissett; *Torula herbarum* (Pers.) Link. Из всех выделенных видов облигатными морскими являются только *Acremonium fuci* Summerb., Zuccaro & W. Gams и *Paradendryphiella salina* (G.K. Sutherl.) Woudenberg & Crous [17]. Все остальные известны также из почвенных и пресноводных местообитаний, большинство, в том числе, и в окрестностях ББС [16].

Наиболее обычными видами, обнаруженными не менее чем в 50% образцов, и образовавшими относительно большое число колоний, являются *Tolypocladium cylindrosporum* W. Gams (227 колоний/36 образцов), *Penicillium chrysogenum* Thom (123/40), *Tolypocladium inflatum* W. Gams (87/27), *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling (86/25) и *Pseudogymnoascus pannorum* (Link) Minnis & D.L. Lindne (54/28; 4 изолята с плодовыми телами, остальные — только с конидиями). Еще 10 видов были обнаружены не менее чем в 10 образцах. Остальная, большая часть, морфотипов — 121, была обнаружена менее чем в 10 образцах, и многие из них — единичными колониями в отдельных образцах. На уровне родов наиболее разнообразным и широко представленным был *Penicillium* — 17 видов и один неидентифицированный морфотип, 392 колонии в 48 образцах. Далее следуют *Acremonium* (8 видов и 4 неидентифицированных морфотипов, 108 колоний в 31 образце) и *Trichoderma* (6 видов и 3 неидентифицированных морфотипа, 45 колоний в 19 образцах). При меньшем разнообразии род *Tolypocladium* показал высокую численность и встречаемость (329 колоний/45 образцов). 133 стерильные колонии были выделены из 43 образцов. По морфолого-культуральным признакам мы разделили их на 43 морфотипа, из которых 26 были светлоокрашенными, и 17 — меланизированными. В целом, в микобиоте также преобладали светлоокрашенные формы.

В таксономической структуре микобиоты абсолютно преобладают аскомицеты (табл. 1): их доля в общем числе выделенных изолятов составила не менее 89,2%. Среди них, в свою очередь, наиболее обильно представленными классами являются Eurotiomycetes и Sordariomycetes. Последний также лидирует по разнообразию — от морфо-

типов до порядков. Общее число выделенных зигомицетов крайне невелико: всего 19 колоний 6 видов в 11 образцах.

В целом, такая структура микобиоты не явилась большой неожиданностью. О том, что в морских экотопах преобладают аскомицеты, а при культуральных исследованиях — их анаморфные формы, известно давно [2, 17]. Преобладание аскомицетов в морских экотопах показано при использовании не только прямых и культуральных, но и молекулярных методов [7, 11, 18]. В предыдущих исследованиях микобиоты донных грунтов Белого моря, как и донных грунтов отделяющихся от Белого моря озер, также были показаны преобладание анаморф аскомицетов, высокая доля представителей родов *Penicillium* и *Tolypocladium*, преобладание светлоокрашенных форм [5, 10, 19]. Подобные особенности известны и для грунтов других холодноводных морей [6, 9, 12]. Заметной отличительной особенностью микобиоты исследованных нами образцов было максимальное обилие аскомицетов из класса Sordariomycetes. В предыдущих исследованиях в окрестностях ББС [5, 10] эта группа была малочисленнее, чем Eurotiomycetes. Таким образом, выявленная нами микобиота имеет многие черты, характерные для исследованных ранее сообществ грибов донных грунтов различных холодноводных морей. Ее основной отличительной особенностью является наибольшее обилие и разнообразие представителей класса Sordariomycetes.

Статистический анализ разнообразия и структуры микобиоты. Значения индекса Шеннона колебались от 0,97 до 2,8 в отдельных образцах, в среднем — 2,2. Значения выше 2 являются довольно высокими для микобиоты морских осадков [3, 9]. Значения индекса Пielу — от 0,59 до 0,96 в отдельных образцах, в среднем — 0,88, что также относительно высоко.

Построенная нами кумулятивная кривая накопления видов не вышла на плато (рисунок), что свидетельствует о том, что полностью разнообразие микобиоты в нашей работе не выявлено. Кроме того, кривая поднимается плавно, следовательно, для выявления видового богатства нужно использовать большее число образцов. Например, обработка 20 образцов позволила обнаружить около 50% общего видового богатства, 30 образцов — около 70%. Расчет с поправкой Chao2 показал, что ожидаемое полное число видов на исследованном участке составляет 167. Таким образом, в нашей работе разнообразие выявлено примерно на 81% от теоретически возможного. Следует заметить, что нам не известны работы в области морской микологии, в которых бы применялась подобная статистическая оценка видового разнообразия. Но учитывая, что в большинстве работ по разнообразию бентосной микобиоты количество образцов составляет 10–20, реже около 30, можно предпо-

лагать, что это (наряду с относительно небольшим числом работ в целом) может являться причиной общей низкой изученности микобиоты морских грунтов.

Расчеты индексов сходства для отдельных образцов показали их относительно низкие значения: для индекса Сьеренсена – немного выше (от 7,1 до 64,7%, в среднем – 32,4%), для индекса Брей-Кертис – немного ниже (от 5,3 до 57,8%, в среднем – 28,9%). Тем не менее, дальнейший анализ методом многомерного шкалирования в обоих случаях продемонстрировал достоверное объединение образцов в группы в соответствии с рядом параметров. Уровень значимости достоверности выделения группировки для индекса Сьеренсена по ANOSIM показал следующие значения: 1) год отбора – 0,2; 2) тип осадка – 0,6; 3) глубина – 37,6; 4) тип экотопа – 1,7; 5) тип осадка + год отбора – 0,1; 6) тип экотопа + год – 0,1. Для индекса Брей-Кертис картина принципиально такая же. Таким образом, объединение образцов недостоверно только по глубине отбора, а наилуч-

шее объединение происходит при комбинации года отбора с типом грунта и типом экотопа. Тип экотопа в большинстве случаев связан с типом грунта: заиление происходит или на более закрытых участках берега, или на участках с пресным стоком, т.е. важнейшим фактором для формирования микобиоты является тип грунта, связанный с типом берега и наличием пресного стока. Кроме того, от года к году в микобиоте донных грунтов могут происходить значительные изменения, что было показано нами на примере двухлетних наблюдений. Очевидно, что эти различия могут быть связаны с множеством погодных факторов, которые в рамках данной работы не было возможности вычленить. В общей сложности 17 видов могут являться определяющим для объединения групп (табл. 2), но их распределение и пропорции зависят от конкретной группы и слабо зависят от значения индекса сходства. Например, при увеличении заиления, из сообщества определяющих видов пропадают представители рода *Tolypocladium*, но увеличивается разнообразие *Penicillium*. Кроме

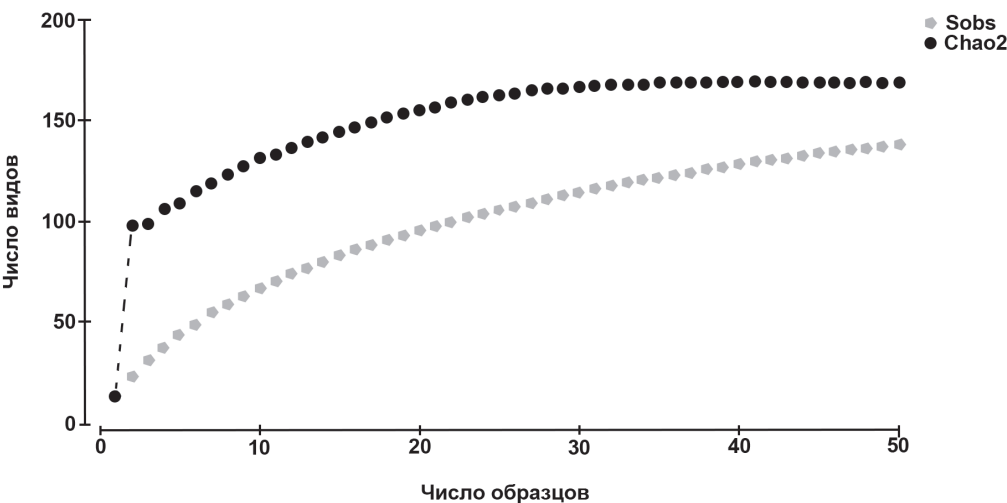


Рисунок. Зависимость кумулятивных кривых накопления числа видов от числа взятых образцов и использования поправки Чао (Chao2) на встречаемость редких видов. Sobs – наблюдаемое число видов; Chao2 – число видов, скорректированное по методу Чао [13].

Таблица 2

Виды, отвечающие за объединение групп по признаку тип экотопа + год. Приводится на основе расчета индекса сходства Сьеренсена

Группа	Тип грунта	Среднее сходство	Виды
Открытый берег без пресного стока, 2016	Слабозаиленный песок	31,42	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> , <i>Tolypocladium inflatum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Penicillium aurantiogriseum</i>
Открытый берег без пресного стока, 2017	Слабозаиленный песок	33,63	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Tolypocladium inflatum</i>
Открытый берег, пресный сток, 2016	Сильнозаиленный песок	31,89	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Tolypocladium inflatum</i> , <i>Penicillium thomii</i> , <i>Cylindrocarpum magnusianum</i>
Открытый берег, пресный сток, 2017	Сильнозаиленный песок	41,55	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Sarocladium strictum</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> , <i>Penicillium nalgiovense</i>
Полузакрытая бухта, пресный сток, 2016	Ил с небольшим количеством песка	40,27	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> , <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Penicillium citrinum</i>
Полузакрытая бухта, пресный сток, 2017	Ил с небольшим количеством песка	23,86	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Paradendryphiella salina</i> , <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Umbelopsis ramanniana</i> , <i>Acremonium murorum</i> , <i>Sarocladium strictum</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Закрытая губа, 2016	Ил	33,12	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>Pseudoeurotium hygrophilum</i> , <i>Fusarium roseum</i>

того, увеличивается разнообразие *Cephalosporium*-подобных грибов и общее разнообразие группы определяющих видов. На результаты также влияет год исследования. Например, в 2016 г. на открытых берегах без пресного стока одним из определяющих видов был *Pseudogymnoascus pannorum*, пропавший в 2017 г., хотя в основном эти сообщества схожи. На участках с заиливанием разница по годам проявляется более заметно.

Таким образом, мы предприняли попытку оценить видовое разнообразие и структуру микобиоты донных морских осадков с помощью методов статистического анализа. Определенно, этот подход полезен, так как позволяет яснее понять получаемые при посевах результаты. С помощью этого подхода можно достаточно уверенно определить влияние на состав и структуру морской донной микобиоты типа грунта и типа экотопы; судить об общих различиях в составе и структуре микобиоты в разные годы исследования; о числе

необходимых образцов для наиболее полного выявления видового разнообразия.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-04-00882а: обработка и анализ первичных данных по видовому составу) и гранта МГУ имени М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ «Депозитарий живых систем Московского университета» в рамках Программы развития МГУ (статистическая обработка). Авторы выражают признательность водозлазной службе ББС за помощь в организации сбора материалов исследования, а также М.В. Чикиной (Институт океанологии им. П.П. Ширшова) за обсуждение результатов.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bongiorni L.* Thraustochytrids, a neglected component of organic matter decomposition and food webs in marine sediments // *Biology of marine fungi. Progress in molecular and subcellular biology.* Vol. 53 / Ed. C. Raghukumar. Berlin—Heidelberg: Springer, 2012. P. 1–15.
2. *Kohlmeyer J., Kohlmeyer E.* Marine mycology, the higher fungi. N.Y.—San Francisco—London: Academic Press, 1979. 690 pp.
3. *Khudyakova Yu.V., Pivkin M.V., Kuznetsova T.A., Svetashev V.I.* Fungi in sediments of the Sea of Japan and their biologically active metabolites // *Microbiology.* 2000. Vol. 69. N 5. P. 608–611.
4. *Damare S., Raghukumar C., Raghukumar S.* Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin // *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 2006. Vol. 53. P. 14–27.
5. *Бубнова Е.Н.* Грибы донных грунтов Кандалакшского залива Белого моря // *Микол. фитопатол.* 2009. Т. 43. № 4. С. 4–11.
6. *Bubnova E.N.* Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea // *Botanica Marina.* 2010. Vol. 53. N 6. P. 595–600.
7. *Nagano Y., Nagahama T.* Cultured and uncultured fungal diversity in Deep-Sea environments // *Biology of marine fungi. Progress in molecular and subcellular biology.* Vol. 53 / Ed. C. Raghukumar. Berlin—Heidelberg: Springer, 2012. P. 173–189.
8. *Bubnova E.N., Nikitin D.A.* Fungi in bottom sediments of the Barents and Kara seas // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. Vol. 43. N 5. P. 400–406.
9. *Бубнова Е.Н., Коновалова О.П.* Разнообразие мицелиальных грибов в грунтах литорали и сублиторали Баренцева моря (окрестности поселка Дальние Зеленцы) // *Микол. фитопатол.* 2018. Т. 52. № 5. С. 320–328.
10. *Khusnullina A.I., Bilanenko E.N., Kurakov A.V.* Microscopic fungi of White Sea sediments // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. Vol. 11. N 5. P. 503–513.
11. *Hagestad O.C., Andersen J.H., Altemark B., Hansen E., Rämä T.* Cultivable marine fungi from the Arctic Archipelago of Svalbard and their antibacterial

activity // *Mycologia.* 2019. Vol. 10. N. 4. DOI: 10.1080/21501203.2019.1708492

12. *Luo Y., Xu W., Luo Z.-H., Pang K.-L.* Diversity and temperature adaptability of cultivable fungi in marina sediments from the Chukchi Sea // *Botanica Marina.* 2020. Vol. 63. N 2. P. 197–207.

13. *Chikina M.V., Basin A.B., Mokievskiy V.O., Kucheruk N.V., Kozlovskiy V.V., Shabalin N.V.* Spatial structure of macro- and meiobenthic communities in a homogeneous environment (on the example of the Pechora Sea) // *Oceanology.* 2019. Vol. 59. N 3. P. 367–373.

14. *Clarke K.R., Warwick R.M.* Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition. Plymouth: Primer-E Ltd, 2001. 172 pp.

15. *Bubnova E.N.* Diversity of the microscopic fungi in the littoral sands of the White sea // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 3. P. 121–127.

16. *Bubnova E.N., Grum-Grzhimaylo O.A., Konovalova O.P., Marfenina O.E.* Fifty Years of mycological studies at the White Sea Biological Station of Moscow State University: challenges, results, and outlook // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 23–39.

17. *Jones E.B.G., Suetrong S., Sakayaroj J., Bahkali A.H., Abdel-Wahab M.A., Boekhout T., Pang K.L.* Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota // *Fungal Diversity.* 2015. Vol. 73. N 1. P. 1–72.

18. *Rämä T., Hassett B.T., Bubnova E.* Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operation taxonomic units and beyond // *Botanica Marina.* 2017. Vol. 60. N 4. P. 433–452.

19. *Grum-Grzhimaylo O.A., Debets J.M., Bilanenko E.N.* Mosaic structure of the fungal community in the Kislo-Sladkoe Lake that is detaching from the White Sea // *Polar Biology.* 2018. Vol. 41. N 10. P. 2075–2089.

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

После доработки 05.07.2020 г.

Принята в печать 07.07. 2020 г.

RESEARCH ARTICLE

On the composition and structure of the community of mycelial fungi in the bottom sediments of the White Sea

E.N. Bubnova^{1,*}, O.A. Grum-Grzhimailo¹, V.V. Kozlovsky²

¹N.A. Pertsov White Sea Biological Station, Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, 119234, Moscow, Russia;

²Marine research center, Moscow State University, office 402, MSU Science park, Leninskiye Gory 1–77, 119234, Moscow, Russia

*e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

50 samples of bottom sediments of Kandalaksha Bay of the White Sea were taken in 2016–2017 from depths of 1.5–15 meters of which 1419 colonies of culturable filamentous fungi were obtained. Based on morphological and cultural features, a total of 136 morphotypes were classified, 81 of these were identified to a species. We discovered 13 species new to the White Sea. The most common were *Tolypocladium cylindrosporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Tolypocladium inflatum*, *Penicillium glabrum* and the anamorph of *Pseudogymnoascus pannorum*. The dominance of ascomycetous fungi was a common characteristic of the mycobiota due to the anamorphic species, and the class Sordariomycetes was the most prevailing group. Assessment of species richness using a cumulative curve and the calculation of the expected total number of species adjusted using Chao2 showed that about 81% of the species diversity was found. The ordination of samples by the nMDS with the ANOSIM test showed the high importance of combining the samples into groups based on the year of sampling and type of sediment, as well as the year of sampling and type of ecotope. Therefore, the type of sediment associated with the type of coast and the presence of fresh inflow is the most important factor for the formation of mycobiota. Moreover, the communities of mycelial fungi change from year to year in the studied bottom sediments.

Keywords: *marine fungi, Ascomycota, bottom sediments, diversity, White Sea, ordination of communities*

Сведения об авторах

Бубнова Екатерина Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Грум-Гржимайло Ольга Алексеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: olgrgr@wsbs-msu.ru

Козловский Владислав Владимирович — канд. биол. наук, начальник отдела экологии Центра морских исследований МГУ. Тел.: 8-495-648-65-88; e-mail: vladkst@gmail.com

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных Elibrary.ru, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, а английская – в Scopus, Google Scholar, CAB International, Academic OneFile, CAB Abstracts, Gale, Global Health, Health Reference Center Academic, OCLC и Summon by Serial Solutions и др.

Желающим опубликовать свою статью в журнале необходимо сдать вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Форма договора с издателем и дополнительная юридическая информация размещены на сайте «Pleiades Publishing». Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3500 слов (шрифт Times New Roman, кегль 12, межстрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине), включая список литературы и резюме на английском языке. В отдельных случаях допустимо увеличение объема по согласованию с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (заглавными буквами, полужирным шрифтом), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера**Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}**

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, СО РАН,
Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение,
Новосибирский государственный университет,
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово «введение» не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию....», где позднее ответственный секретарь редколлегии укажет дату поступления рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

*Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:***Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis****N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}**

¹Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;

²Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: kolosova@mail.ru

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого, его смысл не терялся и все элементы были отличимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) должен включать не более 25 ссылок. В обзорных статьях возможно увеличение списка литературы по согласованию с редакцией.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные рецензируемые статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие. Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (*если редактора два, то между ними ставится и/and*). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название тезисов // Название сборника тезисов (*как на обложке сборника*). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (*инициалы после фамилии*). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). *Дата обращения – это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.*

7) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП – Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry – J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва – М., New York – N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Hayflick L. Progress in cytogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. exper. биол. мед. 2001. Т. 132. № 8. С. 228–229.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.

Птушенко Е.С., Иноземцев А.А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

Статья в сборнике:

Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

Тезисы докладов (материалы) конференции:

Болеева Г.С., Борzych А.А. Механизмы повышения адренореактивности 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.

Автореферат диссертации:

Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.07.2014).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).

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.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Особенности оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Авторам необходимо предложить 2–3 потенциальных рецензентов для своей статьи (предложенные кандидаты не должны иметь с авторами совместных публикаций и не должны работать в той же организации, где работают авторы). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Просьба указывать в тексте письма мобильные телефоны авторов, ответственных за работу над рукописью.