

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 72 • № 4 • 2017 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Клеточная биология

- Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеляк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до “органов-на-чипах” 187

Вирусология

- Кондакова О.А., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки 199
- Трифорова Е.А., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Донченко Е.К., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Сравнительное изучение термической перестройки вирусов с икосаэдрическим и спиральным типом симметрии 209

Биофизика

- Фурсова П.В., Воронова Е.Н., Левич А.П., Рисник Д.В., Погосян С.И. Отбор видов водорослей в состав лабораторного альгоценоза по их гидробиологическим и биофизическим характеристикам 215

Методы

- Котлярова М.С., Архипова А.Ю., Мойсенович А.М., Куликов Д.А., Куликов А.В., Коньков А.С., Бобров М.А., Агапов И.И., Мойсенович М.М., Молочков А.В., Гончаренко А.В., Шайтан К.В. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина для регенерации костной ткани. 222
- Чертков О.В., Валиева М.Е., Малюченко Н.В., Феофанов А.В. Анализ структуры нуклеосом в полиакриламидном геле методом Фёрстеровского резонансного переноса энергии 229

Микробиология

- Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17S, для очистки промышленных стоков 235
- Попова Е.А., Бедненко Д.М., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. Секретция микромицетами внеклеточных протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам. 241

Молекулярная биология

- Суханова Е.В., Зименс Е.А., Парфенова В.В., Белых О.И. Разнообразие генов поликетидсинтаз в геномах гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из эпипитических биопленок озера Байкал 246
- Хсиех Ф.К., Козлова А.Л., Герасимова Н.С., Котова Е.Ю., Формоза Т., Студитский В.М. Роль белка Nhr6 в транскрипции нуклеосом *in vitro*. 253

Геронтология

- Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. Есть ли у старения цель? 258

Экология

- Белых О.И., Фёдорова Г.А., Кузьмин А.В., Тихонова И.В., Тимошкин О.А., Сорокови-кова Е.Г. Обнаружение микроцистинов в цианобактериальных обрастаниях различных субстратов прибрежной зоны озера Байкал 262
- Указатель статей, опубликованных в журнале “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” в 2017 году 270

CONTENTS

Cell Biology

- Alpeeva E.V., Sidorenkova A.F., Vorotelyak E.A.* Overview of cell models: from organs cultured in a Petri dish to “organs-on-chips” 187

Virology

- Kondakova O.A., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Atabekov J.G., Karpova O.V.* Rotavirus vaccines: new strategies and approaches. 199
- Trifonova E.A., Nikitin N.A., Arkhipenko M.V., Donchenko E.K., Atabekov J.G., Karpova O.V.* Comparative study of the thermal remodelling of viruses with icosahedral and helical symmetry 209

Biophysics

- Fursova P.V., Voronova E.N., Levich A.P., Risnik D.V., Pogosyan S.I.* Selection of species for the laboratory algal community by their hydrobiological and biophysical characteristics. 215

Methods

- Kotliarova M.S., Arkhipova A.Yu., Moysenovich A.M., Kulikov D.A., Kulikov A.V., Kon'kov A.S., Bobrov M.A., Agapov I.I., Moisenovich M.M., Molochkov A.V., Goncharenko A.V., Shaitan K.V.* Bioresorbable scaffolds based on fibroin for bone tissue regeneration 222
- Chertkov O.V., Valieva M.E., Malyuchenko N.V., Feofanov A.V.* Analysis of nucleosome structure in polyacrylamide gel using Förster resonance energy transfer method 229

Microbiology

- Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V.* The possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17S, for cleaning of industrial wastewater 235
- Popova E.A., Bednenko D.M., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kotova I.B., Egorov N.S.* Secretion of extracellular proteinases, active against fibrillary proteins, by micro-mycetes 241

Molecular biology

- Sukhanova E.V., Zimens E.A., Parfenova V.V., Belykh O.I.* Diversity of polyketide synthase genes in the genomes of heterotrophic microorganisms isolated from epilithic biofilms in Lake Baikal 246
- Hsieh F.K., Kozlova A.L., Gerasimova N.S., Kotova E., Formosa T., Studitsky V.M.* Role of Nhp6 protein in transcription through a nucleosome *in vitro* 253

Gerontology

- Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* Does aging have a purpose? 258

Ecology

- Belykh O.I., Fedorova G.A., Kuzmin A.V., Tikhonova I.V., Timoshkin O.A., Sorokovikova E.G.* Microcystin-producing cyanobacteria in biofilms from the littoral zone of Lake Baikal. . 262
- Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2016 270*

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.085.2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ:
ОТ ОРГАНОВ В ЧАШКЕ ПЕТРИ ДО “ОРГАНОВ-НА-ЧИПАХ”Е.В. Алпеева^{1,2,*}, А.Ф. Сидоренкова¹, Е.А. Воротеляк^{1,2}¹Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

*e-mail: alpееva_l@mail.ru

В обзоре отражена история появления и усовершенствования клеточных моделей и различных способов и систем культивирования клеток животных и человека для исследований биологической активности различных веществ *in vitro*. Культуры органов и традиционные двухмерные культуры диссоциированных клеток различных типов, таких как первичные, опухолевые, индуцированные плюрипотентные, стволовые и другие, имеют преимущества и недостатки, однако зачастую не являются адекватными моделями для изучения биологических процессов, происходящих в живых организмах. В настоящее время на ранних фазах разработки лекарственных препаратов для отбора наиболее активных соединений и оценки их цитотоксического действия широко используется высокопроизводительный клеточный скрининг с применением различных способов детекции сигнала: оптических на основе колориметрических, люминесцентных и флуоресцентных методов и электрохимических. Использование животных в качестве моделей для тестирования препаратов все больше подвергается критике из-за низкой степени корреляции между результатами, получаемыми в исследованиях с их использованием, и результатами, получаемыми на человеке, а также из-за дороговизны и этических вопросов. Поэтому много усилий направлено на создание моделей на основе клеток человека. Так появились культуры с трехмерным каркасом для имитации архитектуры тканей *in vivo*, а затем и микроинженерные конструкции на основе законов микрогидродинамики, объединяющие несколько типов клеток, так называемые “органы-на-чипах”, позволяющие воссоздавать физические и химические параметры микроокружения клеток в естественных условиях. Таким образом, экспериментальные клеточные системы с момента появления прошли путь от культивируемых в питательной среде целых органов до практически полной реконструкции органов *in vitro* с использованием различных типов клеток и передовых инженерных решений, что позволяет в настоящее время воссоздавать *in vitro* сложные биологические процессы и более успешно изучать влияние на них различных химических веществ и физических факторов.

Ключевые слова: культура клеток, опухолевые клетки, первичные клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органотипическая культура, живой эквивалент кожи, высокопроизводительный скрининг, тестирование лекарственных препаратов, 3D-культура, микрогидродинамика, “органы-на-чипах”

Культивирование клеток и органов млекопитающих *in vitro* имеет более чем столетнюю историю. Культивирование целых органов является одним из самых ранних способов культивирования тканей и датируется 1897 г., когда Лео Леб, один из первых исследователей канцерогенеза, поддерживал печень, почки, щитовидную железу и яичник кролика на небольших сгустках плазмы *ex vivo* до трех дней [1]. Уже в 1908 г. ученые смогли продемонстрировать культивирование клеток животных отдельно от организма в течение дней и даже месяцев. Однако еще несколько десятилетий после этих первых шагов сложная технология культивирования, недостаток информации о физических и химических требованиях к данному процессу и среде культивирования и просто отсутствие коли-

чественных методов оставались серьезной преградой для развития этого направления клеточной биологии. В 40-е гг. XX века Уилтон Эрл, Дж. О. Гей и их коллеги показали, что клетки из различных тканей можно успешно поддерживать *in vitro* в достаточно простой по составу среде, однако строго придерживаясь определенных принципов культивирования. Начиная с того времени, клеточная культура стала незаменимым объектом для исследований клеточного цикла, взаимодействий цитоплазмы и ядра, заражения различными патогенами, отношений хозяин-паразит, канцерогенеза, действия радиации, выработки различных веществ, в том числе гормонов, клетками, а в дальнейшем и для широчайшего спектра исследований на молекулярном и биохимическом уровне.

Уже на заре развития техники культивирования клеток вне организма клеточные и органные культуры использовались для изучения биологической активности различных химических веществ, включая фармацевтические препараты. Померат и Лик [2] исследовали токсичность более 100 различных веществ на первичных эксплантатах из различных органов куриных эмбрионов и кожи взрослых людей. В своей статье 1954 г. они отмечают ряд преимуществ использования клеточных и органных культур для тестирования лекарственных препаратов по сравнению с исследованиями, проводимыми на животных. К этим преимуществам относятся возможность более тщательного контроля условий проведения эксперимента, получение из одного источника достаточно однородного материала, использование которого позволяет осуществлять статистический анализ результатов, относительная простота методологии, используемых вспомогательных материалов и оборудования, возможность наблюдения на клеточном уровне и получения динамических результатов.

С тех пор методы изучения влияния на организм различных веществ и факторов, используемые *in vitro*, претерпели значительные изменения. В последние десятилетия в связи с быстрым развитием комбинаторной химии и биологии количество и разнообразие соединений, рассматриваемых в качестве лекарственных препаратов, стремительно увеличивается. Путь от «открытия» препарата до его коммерциализации занимает около десяти лет, а затраты составляют сотни миллионов долларов США [3, 4], даже не смотря на то что для ранних фаз разработки лекарственных препаратов в настоящее время используется быстрый, селективный и надежный высокопроизводительный скрининг (ВПС).

С середины 90-х гг. прошлого столетия ВПС дал возможность десятикратного уменьшения стоимости тестирования так называемых библиотек соединений в поисках кандидатов на взаимодействие с белками-мишенями. Скрининг — это оптимизированная конвейерная и зачастую роботизированная процедура, в ходе которой большое количество химических соединений (более 10 тыс.) одновременно проверяется на аффинность или активность по отношению к специальной тестовой системе, имитирующей биологическую. Его принцип заключается в следующем: в специальные планшеты с сотнями лунок малого объема, содержащими тестовую систему (например, иммобилизованную мишень или специальным образом модифицированные целые клетки), робот раскапывает минимальные количества исследуемых веществ или смеси веществ. После внесения пробы данные с планшета считываются, и выявляются лунки с биологической активностью [5]. В зависимости от используемой технологии может детектироваться радиоактивный сигнал, флуоресценция, биолюминесценция, поляризация излучения и т.д. Два самых распространенных вида ВПС — это так называемый фармаколо-

гический скрининг и скрининг с использованием живых клеток *in vitro*. Мишень-ориентированный фармакологический скрининг основан, главным образом, на реакциях ингибирования ферментов и связывания лигандов с рецепторами, которые проводят в тестовой системе без участия живых клеток. Необходимо отметить, что активность молекул лекарственных средств, наблюдаемая при таком виде скрининга, отличается от их активности в живых клетках *in vitro* и тем более *in vivo*. Поэтому компании, проводящие тестирование токсичности препаратов, постепенно переходят к ВПС с использованием клеток, который имеет три основных разновидности: анализ вторичных мессенджеров, анализ генов-репортеров и анализ клеточной пролиферации [6]. Данный вид скрининга проводится в более релевантном микроокружении и, таким образом, является компромиссным вариантом между тестированием на целом организме и фармакологическим скринингом.

Модели культивирования *in vitro* для ВПС с использованием живых клеток

Органная культура/культура эксплантатов

В органной культуре отдельные органы или их кусочки (эксплантаты) культивируют на границе раздела фаз жидкость-газ на плотике из ацетата вискозы, металлической сетке или гелевой подложке, поскольку многочисленные эксперименты показали, что большинство органов или их фрагментов растут на твердом субстрате лучше, чем в жидкости, а воздушная среда предотвращает развитие в них некрозов. При этом они сохраняют, по крайней мере, частично, структурно-функциональные характеристики, что позволяет изучать *ex vivo* происходящие в них нативные процессы. Эксплантаты или срезы ткани сходны по свойствам и возможностям с культурой целых органов, но имеют ряд преимуществ, в частности, они больше подходят для исследований, которые требуют визуальной оценки, иммуногистохимического окрашивания и т.д. Основными ограничениями использования органной культуры и эксплантатов на практике являются высокая трудоемкость их получения, отсутствие протоколов, гарантирующих удовлетворительную жизнеспособность тканей после цикла замораживание-размораживание, и невозможность долгого их поддержания *in vitro*. Поэтому их применение при ВПС ограничено.

Органотипическая культура

При данном способе совместно культивируется несколько типов клеток. Могут использоваться как клетки с ограниченным митотическим потенциалом, так и иммортализованные. Органотипические культуры могут также включать в себя поддерживающий матрикс или трехмерный каркас для имитации архитектуры и морфологии тканей *in vivo*.

Было показано, что комбинирование различных типов клеток имеет решающее значение для создания определенной клеточной организации, при которой клетки функционируют практически так же, как в естественных условиях, т.е. в целом организме. Модели кожи — это достаточно хорошо охарактеризованные органотипические системы, которые могут служить так называемым живым эквивалентом кожи (ЖЭК) в клинической практике. О них мы хотели бы рассказать подробнее.

ЖЭК — это тканевая трехмерная конструкция, состоящая из слоя кератиноцитов и лежащего под ним слоя фибробластов, погруженных в матрицу, имитирующую внеклеточный матрикс [7]. Сейчас существуют и широко применяются несколько коммерческих вариантов ЖЭК, пригодных для изучения токсического действия веществ *in vitro*: StrataTest®, EpiDerm®, EpiSkin®, EST-1000®, эпидермальная модель кожи Лейдена [8]. Необходимость создания этих моделей была продиктована, с одной стороны, запретом тестирования косметической продукции на животных в Европе, а с другой стороны, результатами исследований, показавшими, что реакция кожи животных на различные химические раздражители отличается от реакции на них кожи человека. Так, например, только пять из 16 раздражителей являются сходными для кожи человека и кролика [9]. Перечисленные ЖЭК стандартизованы и дают одинаковые результаты испытаний вне зависимости от партии, что является их весомым преимуществом. Они обладают морфологической структурой, схожей с таковой кожи человека, но, как правило, имеют более тонкий слой ороговевающего эпителия [7]. Эпидермис этих ЖЭК имеет хорошую барьерную функцию, что и позволяет использовать их в дерматологических исследованиях.

Обширное применение ЖЭК находят в исследованиях, посвященных изучению коррозии кожи под влиянием различных раздражителей. Одним из критериев для оценки действия веществ на кожу служит уровень экспрессии в ней провоспалительного цитокина интерлейкина 1, альфа, секретируемого кератиноцитами и нейтрофилами. Он индуцирует спонтанное воспаление, вызывает различные поражения, стимулирует пролиферацию клеток и ангиогенез [10]. Другим критерием является количество живых клеток после воздействия раздражителя. Согласно международным нормам, вещество считается безвредным, если выживаемость нижних слоев кератиноцитов после трех минут его воздействия на роговой слой кожи составляет больше 50%, а после 60 мин. — больше 15%. Много работ посвящено изучению влияния додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS) на моделях ЖЭК. SDS — сильный детергент, широко используемый в косметической и бытовой промышленности, вызывающий при воздействии на кератиноциты кожи экспрессию провоспалительных цитокинов и воспалительных хемокинов по сигнальному пути фактора некроза опухоли [11]. При воздействии в течение

4 ч 1%-ным SDS на EST-1000® процент живых клеток составил более половины от изначального количества, что говорит о хорошей барьерной функции данной модели [12]. Результаты исследований влияния SDS на StrataTest® также свидетельствуют о возможности применения этого вида ЖЭК для изучения действия раздражителей разной силы на кожу человека [13].

В исследованиях воздействия озона (O_3) на ЖЭК, которое вызывало в клетках EpiSkin® образование карбоксильных соединений и большого количества окисленных белков, продемонстрировано антиоксидантное действие витамина С, тиольных производных и растительного экстракта зеленого чая [14].

В экспериментах со StrataTest® были получены аналогичные результаты. Кроме того, был изучен окислительный стресс в результате воздействия на StrataTest® сигаретного дыма. Дым одной сигареты вызывал увеличение концентрации активных форм кислорода в клетках почти в 4 раза [13]. Таким образом, при помощи StrataTest® и EpiSkin® можно моделировать окислительный стресс и изучать эффективность действия антиоксидантов на кожу человека *in vitro*.

StrataTest® также использовали в экспериментах по изучению негативного действия ультрафиолетового излучения (УФ), которые показали, что этот ЖЭК реагирует на УФ аналогично коже человека. При этом экранирование УФ с помощью солнцезащитного крема, наносимого на StrataTest®, способствовало снижению в его клетках уровня образования активных форм кислорода и тиминовых димеров, свидетельствующих о повреждении ДНК [13].

Приведенные выше данные говорят о том, что коммерческие модели эквивалентов кожи являются адекватной системой для фармакологических и токсикологических исследований.

Культура диссоциированных клеток

В настоящее время основной моделью клеточной биологии, использующейся в том числе для исследования воздействия различных веществ и факторов на живые системы *in vitro*, является диссоциированная двухмерная клеточная культура (2D-культура). Успех применения данной модели обусловлен свойством большинства видов клеток животных и человека пролиферировать вне организма в специальных питательных средах и образовывать однородные колонии. К преимуществам культуры диссоциированных клеток можно отнести простоту поддержания *in vitro*, большое количество доступных на рынке расходных материалов, специальных сред, наборов, оборудования для получения и поддержания культур в искусственных условиях, возможность заказа тысяч различных проверенных и охарактеризованных клеточных линий

в специальных клеточных банках, наличие разнообразных молекулярных методик, позволяющих модифицировать линии, изменять в них транскрипцию и трансляцию генов, и, конечно, возможность использовать их при ВПС.

Первичные клеточные линии — культуры клеток, полученные в результате диспергирования ткани или органа протеолитическими ферментами или механическими средствами. В русскоязычной литературе первичной культурой называют гетерогенную совокупность клеток после их выделения из ткани и до первого пассажа, однако за рубежом первичной культурой чаще считают любые линии/штаммы клеток, обладающие ограниченным митотическим потенциалом и, как следствие, ограниченной продолжительностью жизни. Из-за этого, а также потому, что эти линии достаточно сложно культивировать и трансфицировать, их применение для различных исследований ограничено. Однако они обладают определенными преимуществами, такими как неизменные биохимические или структурные свойства и фенотип, и часто реагируют на внешние воздействия так же, как клетки *in vivo* [15].

Линии иммortalизованных (спонтанно или искусственно трансформированных первичных) клеток широко используются для скрининга препаратов, потому что они дешевы, надежны и воспроизводимы, их легко наращивать и поддерживать в культуре, они хорошо переносят криоконсервацию и при размораживании не теряют своих свойств. Обычно иммortalизованные, т.е. “бессмертные” клетки получают из первичных путем генетических модификаций. Однако необходимо отметить, что в результате генетических преобразований эти клетки перестают быть фенотипически идентичными первичным, часто становятся анеуплоидными, дедифференцируются и в итоге лишь незначительно похожи на своих предшественников, т.е. сильно отличаются по характеристикам от аналогичных клеток *in vivo* [16, 17]. Поэтому при их использовании в качестве модели для изучения каких-либо биологических процессов или скрининга лекарств необходимо обязательно проводить оценку адекватности и репрезентативности данной модели.

Линии опухолевых клеток представляют собой клетки той опухоли, из которой они произошли, и широко используются для скрининга противораковых препаратов в фармацевтических исследованиях [18]. Впервые в 1951 г. из клеток опухоли, выделенных у человека, была получена клеточная линия, названная HeLa (клетки карциномы шейки матки), которая до сих пор поддерживается и используется в исследованиях. Несмотря на популярность, линии опухолевых клеток также не являются идеальной моделью для исследований, поскольку имеют и накапливают мутации, которые могут повлиять на результаты экспериментов с их использо-

ванием. Например, клеточная линия рака молочной железы MCF-7 не экспрессирует фермент каспазу-3, который участвует в индукции апоптоза [19].

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) человека обладают неограниченной способностью к самообновлению и могут быть дифференцированы в любой тип клеток. Таким образом, из них можно получить достаточное для ВПС и токсикологических исследований количество нормальных клеток. Использование ЭСК в биологии, фармацевтике и медицине ограничено из-за этических вопросов, поскольку необходимо разрушать эмбрион при выделении этих клеток. Поэтому получение первых иПСК произвело практически революцию в области стволовых клеток и их применения [20]. иПСК представляют собой плюрипотентные клетки, искусственно получаемые из дифференцированных соматических клеток путем индукции функциональных генов плюрипотентности. Эти клетки теряют свойства соматических и становятся похожими на ЭСК с точки зрения морфологии, пролиферации, профиля генной экспрессии и дифференцировочного потенциала. Поскольку иПСК могут быть получены от пациентов с генетическими заболеваниями, они расширяют возможности для разработки лекарств [21].

Системы культивирования клеток

Несмотря на более чем вековой опыт по исследованию на клеточных культурах *in vitro* влияния различных химических соединений и физических факторов, животные до сих пор используются в качестве моделей для проверки критериев “ADMET” (абсорбции, распространения, метаболизма, элиминации и токсичности) при тестировании соединений во время их регистрации в качестве лекарственных препаратов. Хотя данный подход дает возможность анализировать физиологические реакции на уровне целого организма, в исследованиях достаточно часто отмечается низкая степень корреляции между результатами, получаемыми на животных, и результатами, получаемыми на человеке, поскольку имеются значительные межвидовые различия в вызванных болезнью ключевых каскадах реакций и изменениях профилей экспрессии генов [22, 23]. Кроме того, тестирование препаратов на животных дорогое, низкопроизводительное и, как отмечалось выше, часто не удовлетворяет этическим нормам. Также становится все более очевидным, что традиционные 2D-культуры не могут в полной мере воспроизводить биологические свойства тканей *in vivo*, которые существуют в организме в трехмерном (3D) пространстве [24].

Все это подчеркивает критическую потребность в еще более усовершенствованных подходах к моделированию условий *in vitro*, специфичных для человеческого организма.

Сравнение 2D- и 3D-способов культивирования

Автоматизированный скрининг с использованием 2D-культуры клеток в многолуночных планшетах может давать ошибочные результаты при прогнозировании тканеспецифичных ответов, т.к. клетки в монослое теряют свою исходную морфологию и по-другому взаимодействуют с матриксом и между собой. Известно, что клетки, выращенные на двухмерных плоских поверхностях, ведут себя и дифференцируются не так, как клетки в 3D-системах или тканях *in vivo* [25]. Третье измерение обеспечивает дополнительное направление межклеточных взаимодействий, миграции клеток и их морфогенеза, которые имеют решающее значение для регулирования клеточного цикла и функционирования ткани *in vivo*. Так, на 2D-культурах было показано, что гемцитабин является эффективным ингибитором пролиферации опухолевых клеток толстой кишки и яичников. Однако в экспериментах на 3D-системах это не подтвердилось. Более того, клетки рака толстой кишки в 3D-культурах оказались в 180 раз более устойчивыми к противоопухолевым препаратам, чем в 2D-культурах [26]. Подобные результаты позволяют полагать, что при тестировании противораковых препаратов с помощью 3D-моделей опухолей можно получать более достоверную информацию. В целом приведенные выше данные свидетельствуют о том, что 3D-культура клеток (3D-культура) является более подходящей платформой для разработки лекарственных средств.

Статичные и перфузионные клеточные культуры

Широко распространенные платформы ВПС с использованием многолуночных планшетов предполагают анализ в статичном микроокружении: среда заливается в лунки и удаляется из них дискретно и порционно. Такая система не дает возможности долгосрочного поддержания культуры клеток. Кроме того, смена среды в лунках приводит к большим колебаниям параметров микроокружения культуры [27]. Хотя дальнейшая миниатюризация подобных систем могла бы иметь большой потенциал для повышения производительности, относительно высокое отношение площади поверхности к объему жидкости в микролунках приведет к неконтролируемому испарению жидкости и, таким образом, к нежелательным условиям культивирования. Поэтому были предложены модифицированные многолуночные планшеты с интегрированной микрогидродинамической (микрофлюидной) системой, которые показали еще большую производительность при скрининге лекарственных соединений [28] и оценке цитотоксичности противоопухолевых препаратов [29]. Такие перфузионные системы, в которых достигается компенсация испарения жидкости, могут поддерживать культуру клеток в те-

чение длительного времени и использоваться для оценки длительного воздействия на нее лекарств.

Помимо поддержания стабильности клеточной культуры посредством непрерывного обеспечения питательными веществами и удаления отходов жизнедеятельности перфузия также может использоваться для создания градиентов концентрации лекарственного средства, определенного физического микроокружения (например, напряжения сдвига или интерстициального потока жидкости) и создания системы циркуляции веществ для более точной имитации условий *in vivo* [28]. Например, при сравнении хондрогенеза в статичной и перфузионной культуре в последней была выявлена более активная пролиферация хондроцитов и более интенсивный синтез внеклеточного матрикса [30].

Методы подсчета клеток и определения клеточной активности

Неспособность выявить токсическое действие соединений на ранних фазах разработки новых лекарственных препаратов приводит к тому, что около 30% новых кандидатов на роль лекарств в итоге отвергается [31]. Поэтому тестирование на цитотоксичность, которое обычно основывается на подсчете числа клеток и определении их жизнеспособности, стало одним из наиболее важных этапов разработки лекарственных препаратов. Для обычных способов подсчета количества клеток, которые являются трудоемкими и времязатратными, используют гемоцитометр, счетчики клеток или проточную цитометрию. В то же время методы определения жизнеспособности клеток, основанные, например, на выбросе живыми клетками трипанового синего сразу после его поглощения или на поглощении (без выброса) нейтрального красного после добавления данных веществ в среду культивирования, требуют, соответственно, инвазивного применения химических реактивов. Эти методы достаточно низкопроизводительны и, следовательно, плохо подходят для использования при ВПС. Также при ВПС отбор проб ограничен небольшими объемами [32], поэтому необходимо применять прижизненные методы исследования. Методы детектирования, используемые при ВПС на основе клеточных культур, можно разделить главным образом на две группы: электрохимические и оптические.

Электрохимические методы

Электрохимические методы могут быть основаны на выявлении изменений внутриклеточных процессов, барьерных свойствах клеток или образовании электрического потенциала определенными видами клеток [33]. Для данных методов были разработаны различные электрохимические биосенсоры, которые объединяют элементы биологического распознавания и электрохимического преобразования сигнала.

Электрохимические методы, основанные на выявлении изменений внутриклеточных процессов. Живую клетку можно рассматривать как электрохимическую систему [34]. Образование электронов и перенос заряда, вызванные окислительно-восстановительными реакциями, изменение состава и концентрации ионов в живых клетках могут быть использованы для характеристики жизнеспособности клеток в гомогенном растворе [35]. Помимо этого клеточный метаболизм вызывает изменения продуктов обмена (например, молочной кислоты и углекислоты) или субстратов (например, глюкозы и растворенного в цитоплазме кислорода). Различные электрохимические биосенсоры были разработаны для выявления изменений среды культивирования и самих клеток в результате их метаболизма [36–38]. Электрохимические методы, основанные на клеточной активности, включают потенциометрию и амперометрию. Известно, что на метаболическую активность клеток может влиять множество неконтролируемых факторов окружающей среды, что ограничивает применение данного подхода для ВПС на основе клеточных культур.

Электрохимический метод, основанный на барьерных свойствах клеток. Ионный состав среды вокруг погруженного в нее электрода изменяется в присутствии клеток. Как правило, клетки с изолирующими свойствами значительно увеличивают сопротивление электрода [39]. Поэтому жизнеспособность, морфологию, количество клеток, их апоптоз и адгезию, можно оценивать с помощью метода электрохимической импедансной спектроскопии. Например, для количественного анализа живых клеток был разработан новый датчик сопротивления, встраиваемый в дно планшета. С помощью данного устройства можно проводить оценку цитотоксичности и острой токсичности веществ в режиме реального времени [39].

Электрохимический метод, основанный на возбуждении/записи электрического потенциала клеток. Такие клетки и ткани, как сердечная мышца, бета-клетки поджелудочной железы, нервные клетки, способны генерировать биоэлектрические сигналы, возникающие в результате организованной работы ионных каналов клеточной мембраны [33]. Регистрация этих биоэлектрических сигналов может использоваться при тестировании лекарств против сердечной аритмии, гипертонии, болезни Паркинсона, диабета, нейропатической боли и т.д. Данный метод обладает высокой производительностью, высокой чувствительностью, простотой использования и хорошо подходит для неинвазивной детекции клеточной активности электрогенных клеток с возможностью длительного их культивирования.

Хотя электрохимические методы являются неинвазивными и достаточно производительными, они не позволяют получать информацию о конкретных клеточных реакциях, непосредственно связанных с определенными функциями клеток, биомаркерами или сигнальными путями, которая

важна для понимания механизмов действия лекарственных препаратов. Более того, электрохимические методы не применимы для 3D-культур, поскольку требуют прямого контакта клеток с электродом.

Оптические методы

Анализ жизнеспособности клеток и подсчет их количества при ВПС на основе клеточных культур обычно проводят с помощью колориметрических, люминесцентных или флуоресцентных методов.

Колориметрический метод основан на изменении цвета среды после реакции клеточных метаболитов со специальными химическими реагентами. Разработаны колориметрические анализы с использованием рутениевого красителя [40] и аламарового синего [41]. Однако низкая чувствительность рутениевого красителя и низкая надежность аламарового синего ограничивают их применение при ВПС. В продаже имеются наборы для оценки метаболической активности клеточной культуры с использованием солей тетразолия, таких как МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид) [42], МТС (3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий) [43] и ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид), которые восстанавливаются активно растущими клетками до цветного продукта формазана, количественно определяемого при помощи спектрофотометра.

Несмотря на популярность, данные колориметрические методы требуют многократного добавления в культуру химических веществ по определенной схеме, что может нарушать жизнедеятельность клеток [44]. Эти методы являются инвазивными, трудоемкими и времязатратными, а также имеют относительно низкую чувствительность. Кроме того, они обычно позволяют получить данные только в конечной точке эксперимента, что является существенным недостатком для тестов на цитотоксичность *in vitro*. Предпочтительными являются динамические данные, которые более подробно описывают реакции клеток на воздействие лекарств.

Люминесцентные методы. Окисление люциферина, катализируемое ферментом люциферазой, дает свечение, которое можно детектировать при помощи светочувствительных аппаратов, таких как люцинометр или оптический микроскоп [45]. Люцифераза светлячков широко используется в качестве репортера в трансфицированных клетках, в которые введен ген люциферазы под контролем интересующего промотора для оценки его транскрипционной активности [46]. Во многих коммерческих наборах на основе анализа клеточной активности киназ люцифераза используется в качестве репортера. Ее можно также применять для определения клеточного уровня АТФ при тестировании жизнеспособности клеток. Кроме того, некоторые

ферменты, такие как каспаза и цитохром P450, способны превращать в люциферин специальные молекулы-предшественники. Таким образом, активность этих ферментов может быть обнаружена в совмещенном или двухступенчатом анализе на люциферазу [47].

Недостатком люминесцентных методов является то, что на интенсивность биолюминесценции помимо количества люциферазы может влиять множество других факторов, таких как неучтенное поглощение люциферина, наличие кофакторов, прозрачность и pH культуральной среды или буфера, вызывающих расхождения между детектируемым уровнем сигнала и фактическими изменениями клеточной активности [48].

Флуоресцентные методы по сравнению с люминесцентными имеют более высокую чувствительность, и их легче адаптировать для работы с очень малыми объемами проб при высокопроизводительном анализе токсичности химических соединений, клеточных реакций на экзогенные стимулы и активации сигнальных путей [49]. Недавно в качестве флуоресцентных меток стали широко использоваться наночастицы, такие как “квантовые точки”. Эти полупроводниковые нанокристаллы легко вводить в клетки, они фотохимически устойчивы, могут обеспечивать узкое и регулируемое излучение и возбуждаться светом любой длины волны. Различные цвета эмиссии могут быть одновременно получены с использованием наночастиц разного размера, возбуждаемых одноволновым светом [50, 51]. Недостатком “квантовых точек” является то, что они могут обладать клеточной токсичностью. Кроме того, как и при колориметрических методах, их можно использовать только для количественного анализа клеток или клеточной активности в конечной точке, что не дает возможности оценивать динамику клеточной пролиферации или гибели.

Разработка методов на основе репортерных генов с использованием зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) позволила проводить неинвазивный автоматизированный анализ клеточной пролиферации и специфических клеточных функций в реальном времени [52]. Впервые такой анализ был продемонстрирован на клетках яичника китайского хомячка (линия CHO), экспрессирующих GFP под контролем промотора цитомегаловируса человека (CMV) [53]. Со временем GFP и его мутантные формы были получены с цветами эмиссии от синего до желтого. GFP обычно нетоксичен для клеток. Кроме того, GFP может сочетаться с красным флуоресцентным белком *Discosoma species* (dsRed) для двухцветных или мультиплексных анализов [54].

В дополнение можно отметить, что техника на основе эффекта FRET (резонансного переноса энергии), при котором наблюдается изменение длины волны излучения комплекса из двух флуорофоров при разрушении связи в виде небольшого пептид-

ного линкера между ними, может использоваться, например, для изучения активации протеазы каспазы-3 в процессе апоптоза [55].

В целом, системы детекции флуоресценции в живых клетках являются неинвазивными и отвечают требованиям простоты и скорости для применения при ВПС, а также могут использоваться для получения динамических данных. В современных коммерческих ВПС подобного типа используют лазерные сканирующие системы с флуоресцентной микроскопией и количественной обработкой изображений для проведения кинетических анализов на основе живых клеток с высоким пространственным и временным разрешением. Их можно применять для изучения событий, происходящих в живых клетках, количественного определения сшитых с флуоресцентными репортерами внутриклеточных белков и наблюдения за их транспортом, а также за некоторыми субклеточными структурами [56]. Однако высокая стоимость и относительно низкая производительность данных ВПС ограничивают их использование поздними фазами исследований лекарственных препаратов [57]. Более того, системы визуализации на основе флуоресценции ограничены анализом плоских изображений клеток в 2D-культурах.

ВПС на основе 3D-культур для разработки лекарственных препаратов

Флуоресцентный анализ с использованием 3D-культур

Нужно отметить, что недостаточно мощные сигналы флуоресценции экспрессирующих GFP клеток в 2D-культуре могут маскироваться высоким уровнем флуктуирующих фоновых сигналов, наблюдаемым благодаря различным неспецифическим эффектам [58]. Это ограничение можно преодолеть путем культивирования трансфицированных клеток в каркасе из волоконистого полиэтилентерфталата (ПЭТ) в модифицированных лунках, что значительно увеличивает общее количество клеток на единицу площади и уменьшает фоновые шумы [59]. Такая 3D-культура может обеспечить в 20 раз более высокий уровень клеточной флуоресценции и значительно улучшить соотношение сигнал/шум, поскольку клетки концентрируются в каркасе в центре лунки, а фоновую флуоресценцию можно измерить отдельно и вычесть из общего показателя для получения величины истинного сигнала живых клеток. Эта новая платформа флуоресцентной 3D-культуры может давать возможность получения воспроизводимых кинетических данных, которые можно с большей степенью надежности использовать для оценки воздействия лекарств на пролиферацию клеток. Она была успешно применена для изучения цитотоксичности химических веществ и лекарств от рака, демонстрируя возможность использования на ранних стадиях разработки лекарственных препаратов.

Клеточный анализ с использованием микрогидродинамики

Микрогидродинамика — междисциплинарная наука, описывающая поведение малых (порядка микро- и нанолитра) объемов и потоков жидкостей, находящаяся на стыке физики, гидравлики, динамики, химии, биологии и инженерных знаний. Ее развитие способствовало возникновению технологии манипулирования малыми объемами жидкостей с использованием микроструктур, способной произвести революцию в области клеточных исследований. Контролируемое управление микрогидродинамическими устройствами при их размерах, близких к размерам клетки и биомолекул, позволяет использовать их на клеточном уровне, а сеть микроканалов, из которых они состоят, воссоздает микроокружение клеток *in vivo* [28]. Микрогидродинамические системы обладают возможностью очень быстрой доставки веществ клеткам для достижения высоких скоростей реакций и анализа и возможностью строго контролировать перемещение жидкостей и концентрацию в них веществ. Микрогидродинамические системы, оснащенные механизмами внешнего контроля и детекции в реальном времени, могут быть полностью автоматизированы при ВПС.

Были продемонстрированы микротехнологические устройства на основе культур гепатоцитов [60], клеток легких [61] и др. на поверхностях силиконов и полидиметилсилоксана (ПДМС). Ханг с коллегами впервые разработал микрогидродинамическую систему, оснащенную генератором градиента концентрации веществ и способную к длительному клеточному мониторингу [62]. Данное устройство состоит из генератора концентрации и массива микрочаек 10×10 штук, что позволяет проводить параллельно 100 экспериментов с уникальными условиями в каждой ячейке. Подобные устройства можно применять для изучения влияния компонентов и pH культуральной среды, плотности клеток и скорости перфузии на экспрессию белков культурой.

Большинство микрогидродинамических платформ изготавливается с использованием ПДМС, который является оптически прозрачным, газопроницаемым и биосовместимым полимером [28]. Однако из-за своих гидрофобных свойств он может поглощать молекулы гидрофобных веществ. Су с соавт. тестировал цитотоксичность на культуре клеток НЕК с использованием устройств с микроканалами из трех различных пластиков: полистирола (ПС), циклоолефинового полимера (ЦОП) и ПДМС. Оказалось, что ПС и ЦОП могут быть более подходящими материалами при тестировании гидрофобных лекарственных препаратов, чем ПДМС [63].

Описанные выше устройства на основе микрогидродинамики все же не являются идеальной аль-

тернативой обычной клеточной культуре, поскольку все вещества и клетки в них расположены во взаимосвязанной сети замкнутых микроканалов, что затрудняет внесение новых клеток в данную систему. Для решения этой проблемы применяется цифровая микрогидродинамика, которая представляет собой технологию работы с каплями объемом порядка нанолитра на открытой поверхности группы электродов. Например, Барбулович-Над с коллегами представил первую платформу “лаборатория-на-чипе” с использованием данной технологии, способную реализовать основные этапы культивирования клеток млекопитающих: посев клеток, наращивание биомассы, снятие клеток и их пересев на новую поверхность [64].

Микрогидродинамические системы на основе 3D-культур и “органы-на-чипах”

Изначально микрогидродинамические устройства заполнялись 2D-культурами. Затем появились микроустройства на основе 3D-культур. Последние являются релевантной биологической моделью для проведения микромасштабных исследований на основе клеток и для тестирования лекарственных средств. “Органы-на-чипе”, самый продвинутый на сегодняшний день вид данных систем, представляет собой микроинженерную систему, которая имеет в своем составе ключевые функциональные единицы органов человека. Обычно эти системы состоят из прозрачных полимерных 3D-микроканалов, выстланных живыми клетками, и, как и органы *in vivo*, обладают трехмерной микроархитектурой, определяемой пространственным распределением нескольких типов клеток и обеспечивающей их функциональное взаимодействие, а также сложным органоспецифическим микроокружением клеток с конкретными биохимическими и физическими параметрами [65–70]. Эти системы позволяют достаточно точно моделировать *in vitro* сложные биологические процессы.

В последние годы данный подход был использован для конструирования моделей, воссоздающих сложную структуру и функциональность таких органов, как печень, сердце, легкие, кишечник, почки, мозг и кости [65, 71–73]. Весьма показательным примером является микроустройство “легкое-на-чипе”, которое воспроизводит механически активный альвеолярно-капиллярный барьер [66]. Эта модель создана на основе разделенной на отсеки трехмерной микрогидродинамической системы, в которой альвеолярные эпителиальные клетки культивируются в тесном контакте с легочными микрососудистыми эндотелиальными клетками на тонкой пористой высокоэластичной искусственной мембране, образуя подобие альвеолярно-капиллярной мембраны *in vivo*. Эта система имеет контролируемый компьютером механизм на основе отрицательного давления, который обеспечивает циклическое растяжение альвеолярно-капиллярной

мембраны для имитации дыхательных движений. Важно отметить, что данное устройство позволяет воспроизводить и визуализировать комплексные интегрированные реакции на уровне органов, которые невозможно наблюдать в обычных моделях клеточной культуры, такие как увеличение количества иммунных клеток, мигрирующих из кровяного русла в ответ на бактериальное заражение, их фагоцитарную активность, появление воспалительных цитокинов и попадание наночастиц из окружающей среды [66]. Более того, способность этой модели воссоздавать механическую активность легкого позволила выявить неизученное ранее отрицательное влияние растяжения легочной ткани на ее повреждение и развитие в ней воспалительных процессов.

Ученые продолжают работы в направлении создания искусственных “органов-на-чипах”, расширяя свои модели путем добавления в систему нескольких “органов”, которые имеют тесную взаимосвязь, и получения практически автоматизированного “тела-на-чипе” с максимально возможной функциональностью [74, 75].

Таким образом, благодаря развитию химии, физики и инженерных технологий, в том числе появ-

лению нанотехнологий, биологи, начав в конце XX в. эксперименты по культивированию *in vitro* с культивирования целых органов, пройдя стадию 2D- и 3D-культивирования диссоциированных клеток, в конце концов снова пришли к “органной” культуре, уже представляющей собой биоинженерное устройство. Новая органная культура, “органы-на-чипах”, создается из живых и искусственных элементов по определенным принципам с учетом огромного опыта, накопленного на данный момент в области биологии и смежных наук, чтобы максимально приблизить функциональность данной системы к функциональности органов *in vivo*, но при этом контролировать в ней каждый элемент. Такой подход должен обеспечить в итоге получение идеальной модели, точно воссоздающей *in vitro* сложные биологические процессы для более успешного изучения влияния на них различных химических веществ и физических факторов и более эффективной разработки лекарственных препаратов.

Работа выполнена в рамках дополнительного государственного задания Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН по программе развития биоресурсных коллекций ФАНО на 2017 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loeb L. Über die Entstehung von Bindegewebe, Leucocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebsteile zu zuchten // Chicago: M. Stern and Co., 1897. 72 p.
2. Pomerat C.M., Leake C.D. Short term cultures for drug assays: general considerations // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1954. Vol. 58. P. 1110–1128.
3. DiMasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs // J. Health Econ. 2003. Vol. 22. N 2. P. 151–185.
4. Morgan S., Grootendorst P., Lexchin J., Cunningham C., Greyson D. The cost of drug development: a systematic review // Health Policy. 2011. Vol. 100. N 1. P. 4–17.
5. Sundberg S.A. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches // Curr. Opin. Biotech. 2000. Vol. 11. N 1. P. 47–53.
6. An W.F., Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening // Mol. Biotechnol. 2010. Vol. 45. N 2. P. 180–186.
7. Ponc M., Boelsma E., Gibbs S., Mommaas M. Characterization of reconstructed skin models // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 2002. Vol. 15. N 1. P. 4–17.
8. Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (review) // Sovr. Tehnol. Med. 2017. Vol. 9. N 1. P. 198–218.
9. Jírová D., Basketter D., Liebsch M., Bendová H., Kejlová K., Marriott M., Kandárová H. Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data // Contact Dermatitis. 2010. Vol. 62. N 2. P. 109–116.
10. Bou-Dargham M.J., Khamis Z.I., Cognetta A.B., Sang Q.A. The role of interleukin-1 in inflammatory and malignant human skin diseases and the rationale for targeting interleukin-1 alpha // Med. Res. Rev. 2017. Vol. 37. N 1. P. 180–216.
11. Wang C., An Q., Zhao D., Li M., Zheng H., Zhang J., Liu J., Yang L., Su N. Insight into the mechanism of SDS irritation on human skin keratinocytes by examination of changes in gene expression // Am. J. Biomed. Sci. 2016. Vol. 8. N 4. P. 311–321.
12. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.-J., Vohr H.-W., Fuchs H.W. Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) — A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing // Toxicol. in Vitro. 2005. Vol. 19. N 7. P. 925–929.
13. Rasmussen C., Gratz K., Liebel F., Southall M., Garay M., Bhattacharyya S., Simon N., Vander Zanden M., Van Winkle K., Pirnstill J., Pirnstill S., Comer A., Allen-Hoffmann B.L. The StrataTest® human skin model, a consistent *in vitro* alternative for toxicological testing // Toxicol. in Vitro. 2010. Vol. 24. N 7. P. 2021–2029.
14. Cotovio J., Onno L., Justine P., Lamure S., Catroux P. Generation of oxidative stress in human cutaneous models following *in vitro* ozone exposure // Toxicol. in Vitro. 2001. Vol. 15. N 4–5. P. 357–362.
15. Eglén R., Reisine T. Primary cells and stem cells in drug discovery: emerging tools for high-throughput screening // Assay Drug Dev. Technol. 2011. Vol. 9. N 2. P. 108–124.
16. Allen D.D., Caviedes R., Cárdenas A.M., Shimahara T., Segura-Aguilar J., Caviedes P.A. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies // Drug Dev. Ind. Pharm. 2005. Vol. 31. N 8. P. 757–768.
17. Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies // Curr. Drug Metab. 2008. Vol. 9. N 1. P. 1–11.
18. Sharma S.V., Haber D.A., Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents // Nat. Rev. Cancer. 2010. Vol. 10. N 4. P. 241–253.

19. Jänicke R.U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3 // *Breast Cancer Res. Tr.* 2009. Vol. 117. N 1. P. 219–221.
20. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 26. N 4. P. 663–676.
21. Dashinimaev E.B., Artyuhov A.S., Bolshakov A.P., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. Neurons derived from induced pluripotent stem cells of patients with Down syndrome reproduce early stages of Alzheimer's disease type pathology *in vitro* // *J. Alzheimers Dis.* 2017. Vol. 56. N 2. P. 835–847.
22. Mak I.W., Evaniew N., Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment // *Am. J. Transl. Res.* 2014. Vol. 6. N 2. P. 114–118.
23. Seok J., Warren H.S., Cuenca A.G., et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. N 9. P. 3507–3512.
24. Fitzgerald K.A., Malhotra M., Curtin C.M., O'Brien F.J., O'Driscoll C.M. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery // *J. Control. Release*. 2015. Vol. 215. P. 39–54.
25. Basu S., Yang S.-T. Astrocyte growth and glial cell line-derived neurotrophic factor secretion in three-dimensional polyethylene terephthalate fibrous matrices // *Tissue Eng.* 2005. Vol. 11. N 5–6. P. 940–952.
26. Smitskamp-Wilms E., Pinedo H.M., Veerman G., Ruiz van Haperen V.W., Peters G.J. Postconfluent multilayered cell line cultures for selective screening of gemcitabine // *Eur. J. Cancer*. 1998. Vol. 34. N 6. P. 921–926.
27. Wu M.-H., Urban J.P., Cui Z., Cui Z.F. Development of PDMS microbioreactor with well-defined and homogeneous culture environment for chondrocyte 3-D culture // *Biomed. Microdevices*. 2006. Vol. 8. N 4. P. 331–340.
28. Wu M.-H., Huang S.-B., Lee G.-B. Microfluidic cell culture systems for drug research // *Lab Chip*. 2010. Vol. 10. N 8. P. 939–956.
29. Chen S.-Y., Hung P.J., Lee P.J. Microfluidic array for three-dimensional perfusion culture of human mammary epithelial cells // *Biomed. Microdevices*. 2011. Vol. 13. N 4. P. 753–758.
30. Pazzano D., Mercier K.A., Moran J.M., Fong S.S., DiBisio D.D., Rulfs J.X., Kohles S.S., Bonassar L.J. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture // *Biotechnol. Progr.* 2000. Vol. 16. N 5. P. 893–896.
31. Hughes J.D., Blagg J., Price D.A., et al. Physiochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. Vol. 18. N 17. P. 4872–4875.
32. Betts J.I., Baganz F. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities // *Microb. Cell Fact.* 2006. Vol. 5. 21.
33. Ding L., Du D., Zhang X., Ju H. Trends in cell-based electrochemical biosensors // *Curr. Med. Chem.* 2008. Vol. 15. N 30. P. 3160–3170.
34. Berry M.N., Grivell M.B. An electrochemical description of metabolism // *Bioelectrochemistry of cells and tissues* / Eds. D. Walz, H. Berg, and G. Milazzo. Basel: Birkhauser Verlag, 1995. P. 134–158.
35. Nonner W., Eisenberg B. Electrodiffusion in ionic channels of biological membranes // *J. Mol. Liq.* 2000. Vol. 87. N 2. P. 149–162.
36. Borgmann S., Radtke I., Erichsen T., Blöchl A., Heumann R., Schuhmann W. Electrochemical high-content screening of nitric oxide release from endothelial cells // *Chembiochem.* 2006. Vol. 7. N 4. P. 662–668.
37. Kamei K., Haruyama T., Mie M., Yanagida Y., Aizawa M., Kobatake E. The construction of endothelial cellular biosensing system for the control of blood pressure drugs // *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 19. N 9. P. 1121–1124.
38. May K.M., Wang Y., Bachas L.G., Anderson K.W. Development of a whole-cell-based biosensor for detecting histamine as a model toxin // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. N 14. P. 4156–4161.
39. Yeon J.H., Park J.-K. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip // *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 341. N 2. P. 308–315.
40. Wodnicka M., Guarino R.D., Hemperly J.J., Timmins M.R., Stitt D., Pitner J.B. Novel fluorescent technology platform for high throughput cytotoxicity and proliferation assays // *J. Biomol. Screen.* 2000. Vol. 5. N 3. P. 141–152.
41. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. N 17. P. 5421–5426.
42. Derfus A.M., Chan W.C., Bhatia S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots // *Nano Lett.* 2004. Vol. 4. N 1. P. 11–18.
43. Malich G., Markovic B., Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines // *Toxicology*. 1997. Vol. 124. N 3. P. 179–192.
44. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: A brief note with three hierarchy diagrams // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.
45. Durick K., Negulescu P. Cellular biosensors for drug discovery // *Biosens. Bioelectron.* 2001. Vol. 16. N 7–8. P. 587–592.
46. Fan F., Wood K.V. Bioluminescent assays for high-throughput screening // *Assay Drug Dev. Technol.* 2007. Vol. 5. N 1. P. 127–136.
47. Meisenheimer P.L., O'Brien M.A., Cali J.J. Lumino-genic enzyme substrates: The basis for a new paradigm in assay design // *Promega Notes*. 2008. Vol. 100. P. 22–26.
48. Inoue Y., Tojo A., Sekine R., Soda Y., Kobayashi S., Nomura A., Izawa K., Kitamura T., Okubo T., Ohtomo K. *In vitro* validation of bioluminescent monitoring of disease progression and therapeutic response in leukaemia model animals // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2006. Vol. 33. N 5. P. 557–565.
49. Gribbon P., Sewing A. Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain? // *Drug Discov. Today*. 2003. Vol. 8. N 22. P. 1035–1043.
50. Beske O.E., Goldbard S. High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies // *Drug Discov. Today*. 2002. Vol. 7. N 18. P. S131–S135.
51. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics // *Science*. 2005. Vol. 307. N 5709. P. 538–544.
52. Yang S.T., Zhang X., Wen Y. Microbioreactors for high-throughput cytotoxicity assays // *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* 2008. Vol. 11. P. N 1. 111–127.
53. Hunt L., Jordan M., De Jesus M., Wurm F.M. GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. Vol. 65. N 2. P. 201–205.
54. Wolff M., Wiedenmann J., Nienhaus G.U., Valler M., Heilker R. Novel fluorescent proteins for high-content

- screening // *Drug Discov. Today*. 2006. Vol. 11. N 23–24. P. 1054–1060.
55. Xu X., Gerard A.L., Huang B.C., Anderson D.C., Payan D.G., Luo Y. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. N 8. P. 2034–2035.
56. Abraham V.C., Taylor D.L., Haskins J.R. High content screening applied to large-scale cell biology // *Trends Biotechnol.* 2004. Vol. 22. N 1. P. 15–22.
57. Haney S.A., LaPan P., Pan J., Zhang J. High-content screening moves to the front of the line // *Drug Discov. Today*. 2006. Vol. 11. N 19–20. P. 889–894.
58. Girard P., Jordan M., Tsao M., Wurm F.M. Small-scale bioreactor system for process development and optimization // *Biochem. Eng. J.* 2001. Vol. 7. N 2. P. 117–119.
59. Zhang X., Yang S.-T. High-throughput 3-D cell-based proliferation and cytotoxicity assays for drug screening and bioprocess development // *J. Biotechnol.* 2011. Vol. 151. N 2. P. 186–193.
60. Leclerc E., Sakai Y., Fujii T. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane) // *Biomed. Microdev.* 2003. Vol. 5. N 2. P. 109–114.
61. Viravaidya K., Sin A., Shuler M.L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity // *Biotechnol. Progr.* 2004. Vol. 20. N 1. P. 316–323.
62. Hung P.J., Lee P.J., Sabounchi P., Lin R., Lee L.P. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. Vol. 89. N 1. P. 1–8.
63. Su X., Young E.W., Underkofler H.A., Kamp T.J., January C.T., Beebe D.J. Microfluidic cell culture and its application in high-throughput drug screening: cardiotoxicity assay for hERG channels // *J. Biomol. Screen.* 2011. Vol. 16. N 1. P. 101–111.
64. Barbulovic-Nad I., Au S.H., Wheeler A.R. A microfluidic platform for complete mammalian cell culture // *Lab Chip*. 2010. Vol. 10. N 12. P. 1536–1542.
65. Huh D., Hamilton G.A., Ingber D.E. From 3D cell culture to organs-on-chips // *Trends Cell Biol.* 2011. Vol. 21. N 12. P. 745–754.
66. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip // *Science*. 2010. Vol. 328. N 5986. P. 1662–1668.
67. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering // *Curr. Opin. Biotech.* 2011. Vol. 22. N 5. P. 681–689.
68. Huh D., Leslie D.C., Matthews B.D., Fraser J.P., Jurek S., Hamilton G.A., Thorne K.S., McAlexander M.A., Ingber D.E. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice // *Sci. Transl. Med.* 2012. Vol. 4. N 159. 159ra147.
69. Khetani S.R., Bhatia S.N. Microscale culture of human liver cells for drug development // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26. N 1. P. 120–126.
70. Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. N 14. P. 1883–1900.
71. Huh D., Torisawa Y.S., Hamilton G.A., Kim H.J., Ingber D.E. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-chips // *Lab Chip*. 2012. Vol. 12. N 12. P. 2156–2164.
72. Ghaemmaghami A.M., Hancock M.J., Harrington H., Kaji H., Khademhosseini A. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery // *Drug Discov. Today*. 2012. Vol. 17. N 3–4. P. 173–181.
73. Van der Meer A.D., van den Berg A. Organs-on-chips: breaking the *in vitro* impasse // *Integr. Biol. (Camb.)*. 2012. Vol. 4. N 5. P. 461–470.
74. Esch M.B., King T.L., Shuler M.L. The role of body-on-a-chip devices in drug and toxicity studies // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2011. Vol. 13. P. 55–72.
75. Eisenstein M. Artificial organs: Honey, I shrunk the lungs // *Nature*. 2015. Vol. 519. N 7544. P. S16–S18.

Поступила в редакцию
21.07.2017

Принята к печати
07.09.2017

CELL BIOLOGY

OVERVIEW OF CELL MODELS: FROM ORGANS CULTURED IN A PETRI DISH TO “ORGANS-ON-CHIPS”

E.V. Alpeeva^{1,2,*}, A.F. Sidorenkova¹, E.A. Vorotelyak^{1,2}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,
Vavilov ul. 26, Moscow, 119334, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University,
Ostrovitianov ul. 1, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: alpeeva_l@mail.ru

In this review, we tried to elucidate the origin and development of different animal and human cell culture methodologies used to evaluate the effects of various factors and substances *in vitro*. Organ cultures and conventional two-dimensional cultures of dissociated cells of various types, such as primary, tumor, induced pluripotent, stem, and etc. have their advantages and drawbacks but usually do not represent accurate models for studying biological processes that take place in living organisms. Nowadays high-throughput cell assays on the basis of various methods of signal detection (optical utilizing colorimetric, luminescent and fluorescent methods of detection and electrochemical) are widely used at early stages of drug development for selection of the most active compounds and evaluation of their cytotoxic effects. The use of animals as models for drug testing is being criticized because of the lack of correlation between the results

obtained in studies on them and on humans, and also because of the high cost and ethical issues. Therefore, much effort is put to create models based on human cells. This is how cultures emerged that utilize a three-dimensional network to simulate the architecture of tissues *in vivo*, and then so-called “organs-on-chips” – microfluidic microdevices combining several types of cells, that replicate physical and chemical parameters of the microenvironment of cells in living organisms. In summary, experimental cell models have come a long way from the whole organs cultivated in a growth medium to almost complete reconstruction of organs *in vitro* based on the cutting-edge engineering approach with the use of different cell types. This currently enables to replicate complex biological processes and study the influence of different substances and factors on them more successfully.

Keywords: *cell culture, tumor cells, primary cells, induced pluripotent stem cells, organotypic culture, living skin equivalent, high-throughput assay, drug testing, 3D culture, microfluidics, Organs-on-chips*

Сведения об авторах

Алтеева Елена Викторовна – науч. сотр. Центра коллективного пользования ИБР РАН, инженер отдела регенеративной медицины НИИ Трансляционной медицины РНИМУ. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: alteeva_l@mail.ru

Сидоренкова Анастасия Феликсовна – лаборант лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел. 8-499-135-40-81; e-mail: sidorenkova.anastasia@gmail.com

Воротеляк Екатерина Андреевна – зав. лабораторией клеточной биологии ИБР РАН, руководитель отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ. Тел. 8-499-135-40-81; e-mail: vorotelyak@yandex.ru

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.74

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСА: НОВЫЕ СТРАТЕГИИ И РАЗРАБОТКИ

О.А. Кондакова*, Н.А. Никитин, Е.А. Трифонова, И.Г. Атабеков, О.В. Карпова

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

**e-mail: olgakond1@yandex.ru*

Ротавирусная инфекция — инфекционное заболевание, вызванное ротавирусами. Она является главной причиной тяжелых диарей у детей во всем мире и одним из факторов, определяющих детскую смертность. В настоящее время для вакцинации против ротавирусной инфекции используются только живые ослабленные (аттенуированные) вакцины. Данные вакцины эффективны, но обладают рядом побочных действий, прежде всего, риском возникновения инвагинации кишечника. Осложнения при применении существующих вакцин, как правило, связаны с пероральным введением препаратов и возникают в результате размножения ослабленных живых вакцин в кишечнике человека. В связи с этим, существует необходимость создания современных, эффективных и безопасных препаратов для борьбы с ротавирусной инфекцией, не способных размножаться (реплицироваться) в организме вакцинируемого. В последние годы стали активно разрабатываться и испытываться вакцины нового поколения против ротавирусной инфекции — рекомбинантные вакцины, в том числе, парентерального введения. При этом одной из проблем при создании таких вакцин является сложная антигенная структура ротавируса. В данном обзоре представлен анализ литературы о генетическом и антигенном разнообразии штаммов ротавирусов и географической локализации их эпидемически значимых вариантов. Обсуждаются роль капсидных белков в формировании иммунного ответа на вирус и современное состояние разработок новых кандидатных рекомбинантных вакцин против ротавирусной инфекции.

Ключевые слова: ротавирус, вакцины, капсидный белок, рекомбинантные антигены, вирусоподобные частицы, адъювант

В настоящее время острые кишечные инфекции занимают одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний у детей в возрасте до пяти лет. Ротавирусы (РВ) группы А являются наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей младшего возраста во всем мире. Ежегодно регистрируется два миллиона госпитализаций, 24 млн амбулаторных обращений. Около 215 тыс. детей в возрасте до пяти лет погибает от ротавирусного гастроэнтерита, при этом до 56% летальных случаев фиксируют в Африке и 22% — в Индии [1–3]. Однако эпидемиологические исследования показывают, что и в экономически развитых странах данная проблема стоит достаточно остро [4]. Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции (РВИ) — моновалентная Rotarix и пентавалентная RotaTeq — основаны на живых ослабленных (аттенуированных) штаммах вирусов человека и/или животных, которые способны размножаться в кишечнике человека. Внедрение ротавирусных вакцин значительно сократило количество госпитализаций от РВИ [5], но в результате вакцинации возможны побочные явления и, прежде всего, развитие инвагинации кишечника. Дополнительные риски связаны с зафиксированными случаями появления новых реассортантов

между вакцинными штаммами и циркулирующими вирусами дикого типа. Также существует потенциальная опасность реверсии вакцинных штаммов в вирулентные. Кроме этого, в связи со стоимостью, жесткими условиями транспортировки и хранения аттенуированных вакцин эффективность их применения в экономически неразвитых странах значительно ниже, чем в странах с высоким уровнем жизни. Из-за недостатков аттенуированных вакцин разрабатываются современные рекомбинантные вакцины против РВИ с целью повышения эффективности, безопасности и снижения стоимости препаратов. Предполагается, что такие серьезные последствия применения аттенуированных вакцин, как инвагинация кишечника, связаны с репликацией пероральной вакцины в кишечнике и могут быть преодолены при использовании нереплицирующихся (не способных размножаться в организме вакцинируемого) вакцин парентерального введения. Парентеральные вакцины успешно используются для профилактики заболеваний, вызванных такими мукозальными патогенами, как полиовирус, вирус гепатита А и холерный вибрион. В качестве альтернативы широко используемым сейчас вакцинам инактивированные ротавирусные частицы также пытаются вводить парентерально при вакцинации [6]. Новые кандидат-

ные вакцины следующего поколения против РВИ, главным образом, рекомбинантные вакцины, в том числе парентерального введения, находятся на различных стадиях разработок, доклинических и клинических исследований.

В данном обзоре представлен анализ литературы о генетическом и антигенном разнообразии штаммов РВ, географической локализации их эпидемически значимых вариантов. Обсуждаются роль капсидных белков в формировании иммунного ответа на вирус и современное состояние разработок новых кандидатных рекомбинантных вакцин против РВИ.

Структура вириона ротавирусов

РВ относятся к представителям семейства *Reoviridae* рода *Rotavirus*. Геном РВ состоит из 11 сегментов двухцепочечной РНК, кодирующих шесть структурных (VP1–VP4, VP6 и VP7) и пять или шесть неструктурных (NSP1–NSP6) белков в зависимости от штамма [7, 8]. Зрелая инфекционная частица РВ (вирион) имеет форму, близкую к сферической (около 100 нм в диаметре) и состоит из трех концентрических белковых слоев (triple-layered particle, TLP). Внутренний слой – кор (от англ. core – ядро), диаметром около 40 нм – представляет собой икосаэдр ($T = 1$), состоящий из 60 асимметричных димеров белка VP2, в который заключен вирусный геном и два минорных белка, VP1 и VP3 (ферменты транскрипции). VP1 и VP3 закорены на внутренней оболочке вируса, образованной белком VP2 в области, прилегающей к 12 каналам, проходящим по осям симметрии пятого порядка. Кор вириона окружен 260 тримерами белка VP6, которые образуют средний слой ($T = 13$) и формируют неинфекционные транскрипционно-активные двухслойные частицы диаметром около 80 нм (double-layered particles, DLP). РВИ эффективно иницируется, когда DLP попадает в цитоплазму и начинается синтез вирусных транскриптов. Внешний слой, так же как и средний, является икосаэдрическим капсидом и состоит из 260 тримеров гликопротеина VP7 ($T = 13$) и содержит 60 шипов, образованных асимметричными тримерами белка VP4 [9–14]. Белки VP4 и VP7 являются главными мишенями вируснейтрализующих антител. VP4 расщепляется трипсиноподобными протеазами на два домена VP5* и VP8*, при этом инфекционность вируса значительно усиливается. Одной из отличительных характеристик структуры вириона РВ является наличие 132 каналов трех типов, проникающих через внешний и средний слои. Эти каналы включают в себя 12 каналов типа I, расположенных по осям симметрии пятого порядка, 60 каналов типа II, окружающих каналы I типа, и 60 каналов типа III, окружающие оси симметрии третьего порядка. Каналы типа I присутствуют в слое белка VP2 и служат в качестве выходных каналов для вирусных мРНК во время транскрипции [7].

Классификация ротавирусов, разнообразие штаммов

При классификации РВ их разделяют по меньшей мере на восемь групп (А–Н) на основе антигенных различий белка VP6 [15]. Представители групп А, В, С и Н способны инфицировать человека и других животных, а D, E, F и G были обнаружены только у птиц или свиней. Недавно два штамма, выделенные у собак и летучих мышей, были предварительно отнесены к двум новым группам РВ I и J [15–19]. Большинство заболеваний у людей во всем мире вызываются штаммами РВ группы А [20, 21]. Они были разделены, в свою очередь, на четыре серологические подгруппы, обозначаемые SG I, II, I+II и non I/II в зависимости от наличия или отсутствия VP6-специфических эпитопов. Штаммы, инфицирующие человека, относятся преимущественно к подгруппам SG I или SG II и имеют высокую степень консервативности (87–95%) аминокислотной последовательности белка VP6 [22].

Существует также бинарная классификация штаммов РВ, основанная на последовательности двух структурных белков наружного капсида вируса VP7 (G-протеин) и VP4 (P-протеин), к которым вырабатываются вируснейтрализующие антитела и которые являются основными антигенами. В ней отражаются комбинации серотипов G и P РВ [23]. Система классификации серотипов в настоящее время почти полностью заменена системой классификации генотипов G и P, основанной на различиях в последовательности соответствующих сегментов РНК, кодирующих эти белки. Было показано, что серотипы G (белка VP7) в значительной степени согласуются с генотипами G; таким образом, было принято единое обозначение. Двойная номенклатура была принята для классификации серотипа и генотипа белка VP4: серотипу P, когда он известен (например, P1A), соответствует генотип P в квадратных скобках (например, P[8]). Если оба они известны, серотип P предшествует генотипу P (например, P1A[8]). В настоящее время известно 27 генотипов G и 37 генотипов P (далее для краткости – типы G и P) РВ А человека и животных [24, 25]. Разнообразие штаммов велико и связано с сегментированной природой генома и возможностью реассортации. К 2012 г. 12 G-типов, 15 P-типов и более 70 комбинаций типов G–P РВ А описано у человека (табл. 1) [19, 26]. В 2015 г. описано уже 14 типов G, 17 типов P и около 90 комбинаций G–P [27]. Зафиксировано появление новых комбинаций типов G–P, в том числе, вызывающих локальные вспышки даже в вакцинированных популяциях.

В целом, штаммы РВ, способные заражать человека, распространены по всему миру, хотя различия можно выявить в определенных регионах, как и сезонные колебания проявления инфекции в течение календарного года. По данным метаанализа, в период 1989–2004 гг. четыре типа G (G1, G2, G3 и G4) в комбинации с P[8] или P[4] составляли

Таблица 1

Штаммы ротавируса А человека, различающиеся по комбинации антигенов G и P. (+++) – часто встречающиеся комбинации (74,7% всех штаммов); (++) – редко встречающиеся комбинации (0,2–2%); (+) – эпизодически встречающиеся комбинации (<0,2%); (–) – до настоящего времени не идентифицированы. Данные взяты из [26]

	P[1]	P[2]	P[3]	P[4]	P[5]	P[6]	P[7]	P[8]	P[9]	P[10]	P[11]	P[14]	P[19]	P[25]	P[28]
G1	+	–	+	++	–	++	–	+++	+	+	+	+	+	–	–
G2	–	–	–	+++	–	++	–	++	+	+	+	–	–	–	–
G3	–	–	+	++	–	++	–	+++	+	+	+	+	+	–	–
G4	+	–	–	++	–	++	–	+++	+	+	+	+	–	–	–
G5	+	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
G6	–	–	–	+	–	+	–	+	+	–	+	+	–	–	–
G8	+	+	–	++	–	++	–	++	–	+	–	+	–	–	–
G9	–	–	–	++	+	++	–	+++	+	+	+	–	+	–	–
G10	–	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	–
G11	–	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–
G12	–	–	–	+	–	++	–	++	+	–	–	–	–	–	–
G20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+

88% всех штаммов вируса, вызывавших РВИ. При этом штаммы с типом G1P[8] представляли более 70% РВИ в Северной Америке, Европе и Австралии, но только около 30% инфекций в Южной Америке и Азии и 23% – в Африке. Кроме того, в Африке штаммы с типом P [6] представляли одну треть всех идентифицированных штаммов [28]. Проведенный в 2007–2012 гг. метаанализ показал, что наиболее распространенными комбинациями типов G и P являются G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9[8] и G12P[8], составляя 73% циркулирующих штаммов при доминировании G1P[8] [27].

В 2008 г. была предложена система классификации РВ на основе нуклеотидного анализа всех одиннадцати сегментов РНК. Данная система классификации позволяет лучше понять геномное и антигенное разнообразие штаммов РВ. Система предписывает определенный генотип для каждого из 11 сегментов РНК, и гены VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 различных штаммов РВ А описывают с использованием аббревиатуры Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Nx. На основе данной классификации подавляющее большинство всех штаммов РВ А человека относится к одной из двух типичных групп генотипов (отличающихся от G и P), называемых Wa-like (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) и DS-1-подобными (I2-R2-C2-M2-A2-H2-T2-EH2) [29].

Роль капсидных белков VP7, VP4 и VP6 ротавируса в формировании иммунного ответа

Многочисленные исследования показали важность гуморального звена иммунитета в защите от РВИ. Чибя с соавторами [30] впервые показал, что

защита от РВ связана с уровнями нейтрализующих антител против гомологичного серотипа вируса. Уровень нейтрализующих антител, который был равен или превышал 1/128, обеспечивал защиту от заболевания. В дальнейших исследованиях было показано, что наряду с гомотипическими антителами, нацеленными против вируса того типа, который вызвал РВИ, у детей также обнаруживают и гетеротипические антитела, способные нейтрализовать другие варианты (с другими G–P-типами) вируса, что свидетельствует о наличии перекрестно-реактивных вируснейтрализующих эпитопов [31, 32].

В ряде работ показано, что белки внешнего слоя VP4 и VP7 капсида являются главными мишенями вируснейтрализующих антител. Под действием трипсина белок VP4 расщепляется на два домена – VP8* и VP5*. VP8* образует головку шипа вириона и взаимодействует с рецепторами клетки. В частности, недавно было показано, что VP8* может взаимодействовать специфическим образом с антигенами групп крови системы HBGA (histo-blood group antigens), экспрессируемыми на эпителиальных клетках слизистой оболочки кишечника [33–35]. Было высказано предположение (по аналогии с норовирусом), что антитела к домену VP8* могут блокировать взаимодействие РВ с HBGA, предотвращая адсорбцию вириона, и тем самым обеспечивать защиту. Продуктивная инфекция, вызываемая многими типами РВ А, включая штаммы человека, в пермиссивных клетках также зависит от связывания вирионов с рецепторами семейства интегринов. Показано, что моноклональные нейтрализующие антитела ингибируют связывание домена VP5* с интегрином $\alpha 2\beta 1$ и белка VP7 с интегрином $\alpha 4\beta 1$ [36]. Вируснейтрализующие

эпитопы идентифицированы для белков VP5*, VP8* и VP7 [37–41]. Несмотря на очевидную роль специфических антител к VP4 и VP7 в эффективной защите против вируса, предполагается, что белок VP6 также является важным фактором иммунного ответа [42]. VP6-специфические антитела вырабатываются в большом количестве после инфекции и вакцинации [43] и являются основными антителами, продуцируемыми В-клетками в ответ на РВИ [44–46]. Несмотря на отсутствие нейтрализующих эпитопов, недавно продемонстрирован необычный механизм внутриклеточной нейтрализации вируса VP6 – специфическими антителами. Было показано, что антитела против VP6 ингибируют внутриклеточную вирусную транскрипцию путем связывания каналов первого типа, которое приводит к блокировке выхода мРНК из DLP [47].

Хотя роль Т-клеточного иммунного ответа в защите от РВ мало изучена, хроническая РВИ у детей с иммунодефицитом Т- и/или В-клеток указывают на важность как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета [48]. Показано, что VP6-специфичные Т-хелперы CD4(+) вносят значительный вклад в индукцию протективного иммунного ответа [49, 50]. В ряде работ были идентифицированы CD4(+)-Т-клеточные эпитопы белка VP6 [51, 52].

Живые аттенуированные вакцины

В настоящее время две живые аттенуированные вакцины – моновалентная Rotarix (GlaxoSmith-Kline, Бельгия) (RV1) и пентавалентная RotaTeq (Merck & Co., США) (RV5) – широко используются для иммунизации детей более чем в 100 странах. Кроме этого, три живые аттенуированные моновалентные вакцины получили национальное лицензирование и используются в Индии, Китае и Вьетнаме. Кроме того, несколько кандидатных вакцин – как моновалентных, так и мультивалентных – находятся на различных стадиях клинических испытаний [53].

Вакцина Rotarix получена на основе аттенуированного штамма человека RIX4414 генотипа G1P1A [8]. В состав вакцины RotaTeq входит пять монореассортантных штаммов, полученных на основе бычьего штамма SW3 (G6P7[5]) и представляющих генотипы G1, G2, G3, G4 и P1A[8] человека. Анализ данных, полученных исследователями 24 стран и опубликованных в научных изданиях (48 статей) с 2006 г. по 2016 г., показал, что эффективность вакцин RV1 и RV5 в предотвращении ротавирусной диареи примерно одинакова: медиана для RV1 составляет 84%, 75% и 57% в странах с низким, средним и высоким уровнем детской смертности, соответственно, и для RV5 – 90% в странах с низкой и 45% – в странах с высокой степенью детской смертности [54]. Несмотря на то, что обширные клинические испытания, проводимые до лицензирования вакцин, подтверждают, что RV1 и RV5 – вакцины безопасные, последнее время на-

капливаются данные о серьезном побочном их действии – кишечной инвагинации. Недавнее исследование, проведенное в США, показало, что частота инвагинации значительно увеличилась среди младенцев, которые были вакцинированы RV1: с 0,72 до 5,3 случая на 100 тыс. вакцинированных [55]. Похожие данные были получены и для RV5 в Австралии и США [56, 57]. Метаанализ, проведенный в 2017 г., показал, что риск инвагинации зависит от возраста вакцинируемого и составляет примерно один случай на 50 тыс. вакцинированных детей, если вакцинация происходит в возрасте до 12 нед., и один случай на 20 тыс. вакцинированных детей, если первая вакцинация была проведена позже [58]. Эти данные вызывают серьезные опасения, так как первый вариант реассортантной вакцины, лицензированный в США, был отозван в 1999 г., через один год после начала использования, в связи с увеличившейся частотой инвагинации кишечника до десяти случаев на 100 тыс. вакцинированных [59]. Дополнительные риски связаны с зафиксированными случаями появления новых реассортантов между вакцинными штаммами и циркулирующими вирусами дикого типа [60–63]. Также существует потенциальная опасность реверсии вакцинных штаммов в вирулентные. Кроме этого, были получены данные, что вакцинные препараты RV1 и RV5 контаминированы ДНК свиного цирковируса типа 1 (PCV1) и типа 2 (PCV2), соответственно [64].

Однако главной проблемой использования RV1 и RV5 является снижение эффективности пероральных вакцин в странах с низким уровнем жизни, которое предположительно связывают с высокими уровнями специфических материнских антител против РВ, приобретенных либо трансплацентарно, либо путем грудного вскармливания; с кишечными коинфекциями; с разницей в серотипах между вакцинными и циркулирующими штаммами РВ и дефицитом витаминов и Zn [65, 66]. Кроме этого, в условиях возрастающей миграционной активности во всем мире также увеличивается вероятность падения эффективности вакцинопрофилактики при возникновении и распространении новых эпидемиологически значимых штаммов РВ [67].

Рекомбинантные вакцины

В качестве нового направления борьбы против РВИ в последнее время были предложены вакцины на основе рекомбинантных вирусных и бактериальных векторов. В работе Ксиа с соавторами [68] показано, что внутримышечная и интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусом, несущим гены VP4 и NSP4 РВ, эффективно стимулирует иммунный ответ и обеспечивает значительную защиту от инфекции у новорожденных мышей. Жиранд с соавт. [69] создали другой рекомбинантный аденовирусный вектор, несущий гены белков VP4 и VP7 и бактериального белка флагеллина в качестве адъюванта. Проведено исследова-

ние антигенной специфичности и иммуногенности рекомбинантной вакцины на мышах и показана потенциальная возможность ее применения. Несколько научных групп разрабатывают вакцины против РВИ на основе бактериального вектора с использованием непатогенного штамма *Lactococcus lactis*. Была продемонстрирована эффективная стимуляция иммунного ответа на белки РВ (полученных из штаммов РВ различных видов животных) VP7 [70], VP8 [71], VP4 [72] и VP6 [73] при их пероральном введении мышам в составе рекомбинантного вектора на основе *L. lactis*. Однако данные подходы пока находятся только на стадии разработок и ранних доклинических исследований.

Экспериментальные ДНК-вакцины, кодирующие белки VP4, VP6 или VP7 [74–81], разрабатываются с 1996 г., однако в последние десять лет, насколько нам известно, не было опубликовано работ, в которых сообщалось бы о разработке ДНК-вакцин против РВИ.

Другой перспективный подход связан с получением вирусоподобных частиц (ВПЧ) РВ. ВПЧ получают из структурных вирусных белков, и они имеют сходную с нативным вирусом пространственную структуру и антигенные свойства. ВПЧ лишены вирусного генетического материала, что обеспечивает их безопасность. Многочисленные исследования показали, что одновременная экспрессия структурных белков РВ в клетке приводит к образованию ВПЧ путем самосборки. Были сделаны попытки получить ВПЧ РВ в растениях [82] и клетках млекопитающих [83], однако наиболее успешно используется бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых [84–89]. В отсутствие других белков VP2 формирует пустые частицы. Одновременная коэкспрессия белков VP2 и VP6 приводит к образованию *in vivo* двухслойных ВПЧ (2/6-ВПЧ), сходных с DLP, тогда как совместная экспрессия VP2, VP6 и VP7 с VP4 или без него приводит к формированию трехслойных ВПЧ (2/6/7-ВПЧ или 2/4/6/7-ВПЧ), напоминающих инфекционные TLP. Доклинические исследования на различных моделях животных показали иммуногенность таких ВПЧ и различные уровни защиты от последующего заражения вирусом. Эффективность защиты зависела от композиции белков в ВПЧ, способа введения, типа адъюванта и вида животных. В частности, показано, что 2/6-ВПЧ иммуногенны и обеспечивают частичную защиту у мышей, но не на модели новорожденных гнотобиотических поросят [89–92]. Получение 2/4/6/7-ВПЧ, содержащих белок VP8, сопряжено с определенными сложностями и имеет ограничения, связанные с низким выходом таких частиц. Поэтому для создания различных биоинженерных ВПЧ, несущих на своей поверхности антигенные детерминанты РВ, пытаются использовать капсидные белки других вирусов. Кандидатная вакцина, содержащая 24 копии фрагмента VP8* (аминокислотные остатки 64–223), была получена с использованием частицы норовируса Р в качестве

носителя [93]. Испытания на животных (мышах) показали более высокие титры VP8*-специфических и нейтрализующих антител по сравнению с теми, которые были вызваны свободным VP8*, и значительно более высокие уровни защиты от РВИ. Основываясь на том же принципе, сконструировали рекомбинантные вакцины на основе белка VP8*, находящегося в комплексе с белками-носителями вирусной природы [94]. Существует разработка, основанная на экспрессии в *E. coli* рекомбинантного белка VP8* вместе с белком-носителем (структурным белком мышинового полиомавируса) и дальнейшей сборке ВПЧ *in vitro*. Это позволило повысить выход ВПЧ и снизить стоимость кандидатной вакцины [95]. Несмотря на многочисленные разработки и публикации кандидатные ВПЧ-вакцины против РВИ пока находятся только на стадии доклинических исследований.

Группа МакНил разработала рекомбинантную вакцину, содержащую белок VP6, слитый с мальтозо-связывающим белком (MBP-VP6). После иммунизации мышей MBP-VP6 была продемонстрирована 100%-ная способность к защите от двух штаммов мышинового РВ. Однако этот результат был получен только в присутствии дополнительного адъюванта [96, 97].

В работе Духовлинова с соавт. [98] показано, что рекомбинантная вакцина на основе гибридного белка FliCVP6VP8, включающего фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 РВ А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта, эффективна против РВИ у мышей. Был показан высокий уровень защиты, возникающий при двукратном внутримышечном введении кандидатной вакцины. Полная защита от мышинового штамма РВ после его перорального введения иммунизированным кандидатной вакциной животным связана с продукцией вирусспецифических IgA и IgG в кишечнике и сыворотке крови животных. По мнению авторов, эффективность кандидатной вакцины против РВИ на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 сопоставима с эффективностью коммерческой вакцины RV1, но первой свойственна большая безопасность.

Наиболее успешной из рекомбинантных кандидатных вакцин является вакцина, полученная при экспрессии в *E. coli* белка VP8* штамма вируса человека Wa (G1P1A[8]). Было показано, что при парентеральном введении животным рекомбинантного белка VP8 индуцируются высокие титры гомотипических нейтрализующих антител и титры различного уровня гетеротипических нейтрализующих антител против разных штаммов РВ. Иммуногенность значительно повышалась, когда в генетическую конструкцию включали универсальный CD4(+)-Т-клеточный эпитоп столбнячного токсина Р2. Первая фаза клинического исследования новой парентеральной вакцины Р2-VP8-Р[8], адсорбированной на гидроксиде алюминия в качестве адъюванта, продемонстрировала безопасность и

Таблица 2

Кандидатные рекомбинантные вакцины

Вакцины	Антигенные детерминанты	Источники
Субъединичные рекомбинантные вакцины: VP6 VP8* P2-VP8*-P[8] FliCVP6VP8 MBP-VP6	VP6 VP8* VP8* VP6 + VP8 VP6	[89] [94] [99, 100] [98] [96, 97]
Вакцины на основе вирусоподобных частиц: 2/6-ВПЧ РВ 2/6/7-ВПЧ РВ 8-2/6/7-ВПЧ РВ 8*-2/6/7-ВПЧ РВ 2/4/6/7-ВПЧ РВ VP8*-ВПЧ норовируса VP8*-ВПЧ мышинного полиомавируса	VP2 + VP6 VP2 + VP6 + VP7 VP8-VP2 + VP6 + VP7 VP8*-VP2 + VP6 + VP7 VP2 + VP4 + VP6 + VP7 VP8* VP8*	[82–85, 87, 90, 92] [86, 91] [88] [91] [86] [93] [95]
Вакцины на основе аденовирусных векторов	VP4 + NSP4 VP4 + VP7	[68] [69]
Вакцины на основе бактериальных векторов	VP7 VP8 VP4 VP6	[70] [71] [72] [73]
ДНК-вакцины	VP4, VP6, VP7 VP6	[74, 75, 76, 77] [78–81]

иммуногенность у взрослых и детей разного возраста [99, 100]. Вируснейтрализующие антитела против гомологичного штамма Wa и штамма 89-12 (G1P[8]) были выявлены более чем у 80% младенцев. Вируснейтрализующие гетеротипические антитела к штамму Ds-1 (G2P[4]) и к штамму 1076 (G2P[6]) выявлялись у 32–50% и 17–23% детей, соответственно [100]. Вакцинация P2-VP8-P[8] не оказывала отрицательного влияния на последующий иммунный ответ на RV1, что крайне важно для совместного использования парентеральных и пероральных вакцин с целью достижения оптимальной защиты. Информация о разрабатываемых рекомбинантных вакцинах обобщена в табл. 2.

Живые аттенуированные вакцины против РВИ достаточно эффективны в странах с высоким уровнем доходов. Однако риски, связанные с их применением, и низкая эффективность в экономически неразвитых странах с высокой детской смертностью свидетельствует о необходимости разработки новых подходов для создания вакцин против РВ. Рекомбинантные вакцины, в том числе парентерального введения, являются альтернативной стратегией борьбы с РВИ. Разработка эффективной и

безопасной рекомбинантной вакцины значительно осложняется рядом факторов, прежде всего разнообразием антигенных детерминант и их вариабельностью внутри генотипа, а также ограниченными и противоречивыми данными о механизмах защиты против широкого спектра генотипов и штаммов РВ. Структурные белки РВ VP4, VP6 и VP7, которые содержат основные эпитопы, способные активировать сильный защитный иммунный ответ, являются основой для создания современных вакцин. Многообещающими являются субъединичные рекомбинантные вакцины, в том числе полученные с использованием белков-носителей, а также вакцины на основе вирусоподобных частиц. Такие нереплицирующиеся вакцины будут безопасны, а процесс их получения должен стать более быстрым и экономичным по сравнению с производством новых аттенуированных вакцин. Это позволит оперативно реагировать на меняющуюся эпидемиологическую обстановку и учитывать географические различия в распространении РВ с различными генотипами.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект N 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D., World Health Organization—Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network, Agocs M., Serhan F., de Oliveira L., Mwenda J.M., Mihigo R., Ranjan Wijesinghe P. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013 // Clin. Infect. Dis. 2016. Vol. 62. Suppl. 2. P. S96–S105.
2. Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea // Emerg. Infect. Dis. 2006. Vol. 12. N 2. P. 304–306.
3. Walker C.L., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z.A., O'Brien K.L., Campbell H., Black R.E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea // Lancet. 2013. Vol. 381. N 9875. P. 1405–1416.

4. Desai R., Curns A.T., Steiner C.A., Tate J.E., Patel M.M., Parashar U.D. All-cause gastroenteritis and rotavirus-coded hospitalizations among US children 2000–2009 // *Clin. Infect. Dis.* 2012. Vol. 55. N 4. P. 28–34.
5. Burnett E., Jonesteller C.L., Tate J.E., Yen C., Parashar U.D. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea // *J. Infect Dis.* 2017. Vol. 215. N 11. P. 1666–1672.
6. Jiang B., Genstch J.R., Glass R.I. Inactivated rotavirus vaccines: a priority for accelerated vaccine development // *Vaccine*. 2008. Vol. 26. N 52. P. 6754–6758.
7. Estes M.K., Kapikian A. Rotaviruses // *Fields virology* / Eds. D.M. Knipe, P.M. Howley, J.I. Cohen, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, V.R. Racaniello, and B. Roizman. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. P. 1917–1974.
8. Ciarlet M., Estes M.K. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies // *Encyclopedia of environmental microbiology* / Eds. G. Bitton, D.L. Balkwill, R.S. Burlage, et al. N.Y.: John Wiley & Sons, 2003. P. 2573–2773.
9. Chen J.Z., Settembre E.C., Aoki S.T., Zhang X., Bellamy A.R., Dormitzer P.R., Harrison S.C., Grigorieff N. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106. N 26. P. 10644–10648.
10. Jayaram H., Estes M.K., Prasad B.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication // *Virus Res.* 2004. Vol. 101. N 1. P. 67–81.
11. McClain B., Settembre E., Temple B.R., Bellamy A.R., Harrison S.C. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 397. N 2. P. 587–599.
12. Settembre E.C., Chen J.Z., Dormitzer P.R., Grigorieff N., Harrison S.C. Atomic model of an infectious rotavirus particle Atomic model of an infectious rotavirus particle // *EMBO J.* 2011. Vol. 30. N 2. P. 408–416.
13. Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Prasad B.V., Cohen J., Rey F.A. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. N 7. P. 1485–1497.
14. Long C.P., McDonald S.M. Rotavirus genome replication: Some assembly required // *PLoS Pathog.* 2017. Vol. 13. N 4. e1006242.
15. Matthijnssens J., Otto P.H., Ciarlet M., Desselberger U., Van Ranst M., Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation // *Arch. Virol.* 2012. Vol. 157. N 6. P. 1177–1182.
16. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses // *Fields Virology* / Eds. D.M. Knipe and P. Howley. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. P. 1347–1395.
17. Mihalov-Kovacs E., Gellert A., Marton S., Farkas S.L., Feher E., Oldal M., Jakab F., Martella V., Banyai K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary // *Emerg. Infect. Dis.* 2015. Vol. 21. N 4. P. 660–663.
18. Banyai K., Kemenesi G., Budinski I., Földes F., Zana B., Marton S., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K., Jakab F. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia // *Infect. Genet. Evol.* 2017. Vol. 48. P. 19–26.
19. Matthijnssens J., Martella V., Van Ranst M. Priority paper evaluation: genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses // *Future Virol.* 2010. Vol. 5. N 4. P. 385–390.
20. Desselberger U., Wolleswinkel-van den Bosch J., Mrukowicz J., Rodrigo C., Giaquinto C., Vesikari T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006. Vol. 25. N 1. P. S30–S41.
21. Gray J., Vesikari T., Van Damme P., Giaquinto C., Mrukowicz J., Guarino A., Dagan R., Hania S., Vytautas U. Rotavirus // *J. Pediatr. Gastroenterol.* 2008. Vol. 46. Suppl. 2. P. S24–S31.
22. Tang B., Gilbert J.M., Matsui S.M., Greenberg H.B. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis // *Virology*. 1997. Vol. 237. N 1. P. 89–96.
23. Hoshino Y., Kapikian A.Z. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes // *Arch. Virol. Suppl.* 1996. Vol. 12. P. 99–111.
24. Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald S.M. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) // *Arch. Virol.* 2011. Vol. 156. N 8. P. 1397–1413.
25. Trojnar E., Sachsenroder J., Twardziok S., Reetz J., Otto P.H., Johne R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses // *J. Gen. Virol.* 2013. Vol. 94. N 1. P. 136–142.
26. Banyai K., László B., Duque J., Steele A.D., Nelson E.A., Gentsch J.R., Parashar U.D. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs // *Vaccine*. 2012. Vol. 30. Suppl. 1. P. A122–A130.
27. Dóro R., László B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., Banyai K. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? // *Infect. Genet. Evol.* 2014. Vol. 28. P. 446–461.
28. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine // *Rev. Med. Virol.* 2005. Vol. 15. N 1. P. 29–56.
29. Matthijnssens J., Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans // *Curr. Opin. Virol.* 2012. Vol. 2. N 4. P. 426–433.
30. Chiba S., Yokoyama T., Nakata S., Morita Y., Urasawa T., Taniguchi K., Urasawa S., Nakao T. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies // *Lancet*. 1986. Vol. 2. N 8504. P. 417–421.
31. Gorrell R.J., Bishop R.F. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children // *J. Med. Virol.* 1999. Vol. 57. N 2. P. 204–211.
32. Arias C.F., López S., Mascarenhas J.D., Romero P., Cano P., Gabbay Y.B., de Freitas R.B., Linhares A.C. Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994. Vol. 1. N 1. P. 89–94.
33. Hu L., Crawford S.E., Czako R., Cortes-Penfield N.W., Smith D.F., Le Pendu J., Estes M.K., Prasad B.V. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen // *Nature*. 2012. Vol. 485. N 7397. P. 256–259.
34. Huang P., Xia M., Tan M., Zhong W., Wei C., Wang L., Morrow A., Jiang X. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner // *J. Virol.* 2012. Vol. 86. N 9. P. 4833–4843.
35. Ramani S., Cortes-Penfield N.W., Hu L., Crawford S.E., Czako R., Smith D.F., Kang G., Ramig R.F., Le Pendu J., Prasad B.V., Estes M.K. The VP8* domain of neonatal rota-

- virus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans // *J. Virol.* 2013. Vol. 87. N 13. P. 7255–7264.
36. Fleming F.E., Graham K.L., Taniguchi K., Takada Y., Coulson B.S. Rotavirus neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha 2 beta 1 and alpha 4 beta 1 // *Arch. Virol.* 2007. Vol. 152. N 6. P. 1087–1101.
37. Dyall-Smith M.L., Lazdins I., Tregear G.W., Holmes I.H. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986. Vol. 83. N 10. P. 3465–3468.
38. Larralde G., Li B.G., Kapikian A.Z., Gorziglia M. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein // *J. Virol.* 1991. Vol. 65. N 6. P. 3213–3218.
39. Kovacs-Nolan J., Yoo D., Mine Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus // *Biochem. J.* 2003. Vol. 376. N 1. P. 269–275.
40. Taniguchi K., Maloy W.L., Nishikawa K., Green K.Y., Hoshino Y., Urasawa S., Kapikian A.Z., Chanock R.M., Gorziglia M. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus // *J. Virol.* 1988. Vol. 62. N 7. P. 2421–2426.
41. Coulson B.S., Kirkwood C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype // *J. Virol.* 1991. Vol. 65. N 11. P. 5968–5974.
42. Angel J., Franco M.A., Greenberg H.B. Rotavirus immune responses and correlates of protection // *Curr. Opin. Virol.* 2012. Vol. 2. N 4. P. 419–425.
43. Svensson L., Sheshberadaran H., Vene S., Norrby E., Grandien M., Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections // *J. Gen. Virol.* 1987. Vol. 68. N 3. P. 643–651.
44. Weitkamp J.H., Kallewaard N., Kusuhara K., Bures E., Williams J.V., LaFleur B., Greenberg H. B., Crowe J.E. Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires // *J. Immunol.* 2003. Vol. 171. N 9. P. 4680–4688.
45. Weitkamp J.H., Kallewaard N.L., Bowen A.L., LaFleur B.J., Greenberg H.B., Crowe J.E. VH1-46 is the dominant immunoglobulin heavy chain gene segment in rotavirus-specific memory B cells expressing the intestinal homing receptor alpha4beta7 // *J. Immunol.* 2005. Vol. 174. N 6. P. 3454–3460.
46. Nair N., Newell E.W., Vollmers C., Quake S.R., Morton J.M., Davis M.M., He X.S., Greenberg H.B. High-dimensional immune profiling of total and rotavirus VP6-specific intestinal and circulating B cells by mass cytometry // *Mucosal Immunol.* 2016. Vol. 9. N 1. P. 68–82.
47. Aiyegbo M.S., Sapparapu G., Spiller B.W., Eli I.M., Williams D.R., Kim R., Lee D.E., Liu T., Li S., Woods V.L.Jr, Nannemann D.P., Meiler J., Stewart P.L., Crowe J.E.Jr. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 5. e61101.
48. Gilger M.A., Matson D.O., Conner M.E., Rosenblatt H.M., Finegold M.J., Estes M.K. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency // *J. Pediatr.* 1992. Vol. 120. N 6. P. 912–917.
49. Blutt S.E., Warfield K.L., Estes M.K., Conner M.E. Differential requirements for T cells in viruslike particle- and rotavirus-induced protective immunity // *J. Virol.* 2008. Vol. 82. N 6. P. 3135–3138.
50. McNeal M.M., VanCott J.L., Choi A.H., Basu M., Flint J.A., Stone S.C., Clements J.D., Ward R.L. CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G) // *J. Virol.* 2002. Vol. 76. N 2. P. 560–568.
51. McNeal M.M., Basu M., Bean J.A., Clements J.D., Choi A.H., Ward R.L. Identification of an immunodominant CD4+ T cell epitope in the VP6 protein of rotavirus following intranasal immunization of BALB/c mice // *Virology.* 2007. Vol. 363. N 2. P. 410–418.
52. Zhao W., Pahar B., Sestak K. Identification of rotavirus VP6-specific CD4+ T cell epitopes in a G1P[8] human rotavirus-infected rhesus macaque // *Virology (Auckl).* 2008. Vol. 1. P. 9–15.
53. Defo Z.K., Lee B. New approaches in oral rotavirus vaccines // *Crit. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 42. N 3. P. 495–505.
54. Jonesteller C.L., Burnett E., Yen C., Tate J.E., Parashar U.D. Effectiveness of Rotavirus Vaccination: A systematic review of the first decade of global post-licensure data, 2006–2016 // *Clin. Infect. Dis.* 2017. Vol. 65. N 5. P. 840–850.
55. Weintraub E.S., Baggs J., Duffy J., Vellozzi C., Belongia E.A., Irving S., Klein N.P., Glanz J.M., Jacobsen S.J., Naleway A., Jackson L.A., DeStefano F. Risk of intussusception after monovalent rotavirus vaccination // *N. Engl. J. Med.* 2014. Vol. 370. N 6. P. 513–519.
56. Carlin J.B., Macartney K.K., Lee K.J., Quinn H.E., Buttery J., Lopert R., Bines J., McIntyre P.B. Intussusception risk and disease prevention associated with rotavirus vaccines in Australia's national immunization program // *Clin. Infect. Dis.* 2013. Vol. 57. N 10. P. 1427–1434.
57. Haber P., Patel M., Pan Y., Baggs J., Haber M., Museru O., Yue X., Lewis P., Destefano F., Parashar U.D. Intussusception after rotavirus vaccines reported to US VAERS, 2006–2012 // *Pediatrics.* 2013. Vol. 131. N 6. P. 1042–1049.
58. Koch J., Harder T., von Kries R., Wichmann O. Risk of intussusception after rotavirus vaccination. A systematic literature review and meta-analysis // *Dtsch. Arztebl. Int.* 2017. Vol. 114. N 15. P. 255–262.
59. Simonsen L., Viboud C., Elixhauser A., Taylor R.J., Kapikian A.Z. More on Rota Shield and intussusception: the role of age at the time of vaccination // *J. Infect. Dis.* 2005. Vol. 192. Suppl. 1. P. S36–S43.
60. Boom J.A., Sahni L.C., Payne D.C., Gautam R., Lyde F., Mijatovic-Rustempasic S., Bowen M.D., Tate J.E., Rench M.A., Gentsch J.R., Parashar U.D., Baker C.J. Symptomatic infection and detection of vaccine and vaccine-reassortant rotavirus strains in 5 children: a case series // *J. Infect. Dis.* 2012. Vol. 206. N 8. P. 1275–1279.
61. Hemming M., Vesikari T. Vaccine-derived human-bovine double reassortant rotavirus in infants with acute gastroenteritis // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012. Vol. 31. N 9. P. 992–994.
62. Donato C.M., Ch'ng L.S., Boniface K.F., Crawford N.W., Buttery J.P., Lyon M., Bishop R.F., Kirkwood C.D. Identification of strains of RotaTaq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination // *J. Infect. Dis.* 2012. Vol. 206. N 3. P. 377–383.
63. Victoria J.G., Wang C., Jones M.S., Jaing C., McLoughlin K., Gardner S., Delwart E.L. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus // *J. Virol.* 2010. Vol. 84. N 12. P. 6033–6040.
64. McClenahan S.D., Krause P.R., Uhlenhaut C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines // *Vaccine.* 2011. Vol. 29. N 29–30. P. 4745–4753.
65. Patel M., Shane A.L., Parashar U.D., Jiang B., Gentsch J.R., Glass R.I. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? // *J. Infect. Dis.* 2009. Vol. 200. Suppl. 1. P. S39–S48.
66. Glass R.I., Parashar U., Patel M., Gentsch J., Jiang B. Rotavirus vaccines: successes and challenges // *J. Infect.* 2014. Vol. 68. Suppl. 1. P. S9–S18.

67. Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B., Griffin D.D., Ban-yai K., Ramachandran M., Jain V., Cunliffe N.A., Nakagomi O., Kirkwood C.D., Fischer T.K., Parashar U.D., Bresee J.S., Jiang B., Glass R.I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs // *J. Infect. Dis.* 2005. Vol. 192. Suppl. 1. P. S146–S159.
68. Xie L., Yan M., Wang X., Ye J., Mi K., Yan S., Niu X., Li H., Sun M. Immunogenicity and efficacy in mice of an adenovirus-based bicistronic rotavirus vaccine expressing NSP4 and VP7 // *Virus Res.* 2015. Vol. 210. P. 298–307.
69. Girard A., Roques E., Massie B., Archambault D. Flagellin in fusion with human rotavirus structural proteins exerts an adjuvant effect when delivered with replicating but non-disseminating adenovectors through the intrarectal route // *Mol. Biotechnol.* 2014. Vol. 56. N 5. P. 394–407.
70. Perez C.A., Eichwald C., Burrone O., de Mendoza D. Rotavirus VP7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice // *J. Applied Microbiol.* 2005. Vol. 99. N 5. P. 1158–1164.
71. Marelli B., Perez A. R., Banchio C., de Mendoza D., Magni C. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8* subunit induces specific immune response in mice // *J. Virol. Methods.* 2011. Vol. 175. N 1. P. 28–37.
72. Li Y., Ma G., Li G., Qiao X., Ge J., Tang L., Liu M., Liu L. Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. Vol. 2010. Article ID 708460.
73. Esteban L.E., Temprana C.F., Argüelles M. H., Glikmann G., Castello A.A. Antigenicity and immunogenicity of rotavirus VP6 protein expressed on the surface of *Lactococcus lactis* // *Biomed. Res. Int.* 2013. Vol. 2013. Article ID 298598.
74. Herrmann J.E., Chen S.C., Jones D.H., Tinsley-Bown A., Fynan E.F., Greenberg H.B., Farrar G.H. Immune responses and protection oral immunization with rotavirus obtained by VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles // *Virology.* 1999. Vol. 259. N 1. P. 148–153.
75. Herrmann J.E., Chen S.C., Fynan E.F., Santoro J.C., Greenberg H.B., Robinson H.L. DNA vaccines against rotavirus infections // *Arch. Virol. Suppl.* 1996. Vol. 12. P. 207–215.
76. Herrmann J.E., Chen S.C., Fynan E.F., Santoro J.C., Greenberg H.B., Wang S., Robinson H.L. Protection against rotavirus infections by DNA vaccination // *J. Infect. Dis.* 1996. Vol. 174. Suppl. 1. P. S93–S97.
77. Chen S.C., Fynan E.F., Robinson H.L., Lu S., Greenberg H.B., Santoro J.C., Herrmann J.E. Protective immunity induced by rotavirus DNA vaccines // *Vaccine.* 1997. Vol. 15. N 8. P. 899–902.
78. Yang K., Wang S., Chang K.O., Lu S., Saif L.J., Greenberg H.B., Brinher J.P., Herrmann J.E. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection // *Vaccine.* 2001. Vol. 19. N 23–24. P. 3285–3291.
79. Yuan L., Azevedo M.S., Gonzalez A.M., Jeong K.I., Van Nguyen T., Lewis P., Iasef C., Herrmann J.E., Saif L.J. Mucosal and systemic antibody responses and protection induced by a prime/boost rotavirus-DNA vaccine in a gnotobiotic pig model // *Vaccine.* 2005. Vol. 23. N 30. P. 3925–3936.
80. Chen S.C., Jones D.H., Fynan E.F., Farrar G.H., Clegg J.C., Greenberg H.B., Herrmann J.E. Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles // *J. Virol.* 1998. Vol. 72. N 7. P. 5757–5761.
81. Chen S.C., Fynan E.F., Greenberg H.B., Herrmann J.E. Immunity obtained by gene-gun inoculation of a rotavirus DNA vaccine to the abdominal epidermis or anorectal epithelium // *Vaccine.* 1999. Vol. 17. N 23–24. P. 3171–3176.
82. Pêra F.F., Mutepe D.L., Khan A.M., Els J.H., Mbe-wana S., van Dijk A.A., Rybicki E.P., Hitzeroth I.I. Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana* // *Virol. J.* 2015. Vol. 12. N 1: 205.
83. González S.A., Affranchino J.L. Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6 // *J. Gen. Virol.* 1995. Vol. 76. N 9. P. 2357–2360.
84. Agnello D., Hervé C.A., Lavaux A., Darniot M., Guillon P., Charpilienne A., Pothier P. Intrarectal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles induces an antirotavirus immune response localized in the intestinal mucosa and protects against rotavirus infection in mice // *J. Virol.* 2006. Vol. 80. N 8. P. 3823–3832.
85. Bertolotti-Ciarlet A., Ciarlet M., Crawford S.E., Conner M.E., Estes M.K. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice // *Vaccine.* 2003. Vol. 21. N 25–26. P. 3885–3900.
86. Crawford S.E., Estes M.K., Ciarlet M., Barone C., O'Neal C.M., Cohen J., Conner M.E. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles // *J. Virol.* 1999. Vol. 73. N 6. P. 4813–4822.
87. Fromantin C., Jamot B., Cohen J., Piroth L., Pothier P., Kohli E. Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response // *J. Virol.* 2001. Vol. 75. N 22. P. 11010–11016.
88. Istrate C., Hinkula J., Charpilienne A., Poncet D., Cohen J., Svensson L., Johansen K. Parenteral administration of RF 8-2/6/7 rotavirus-like particles in a one-doseregimen induce protective immunity in mice // *Vaccine.* 2008. Vol. 26. N 35. P. 4594–4601.
89. Lappalainen S., Tamminen K., Vesikari T., Blazevic V. Comparative immunogenicity in mice of rotavirus VP6 tubular structures and virus-like particles // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013. Vol. 9. N 9. P. 1991–2001.
90. Azevedo M., Viasova A., Saif L. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease // *Expert Rev. Vaccines.* 2013. Vol. 12. N 2. P. 169–181.
91. El-Attar L., Oliver S.L., Mackie A., Charpilienne A., Poncet D., Cohen J., Bridger J.C. Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease // *Vaccine.* 2009. Vol. 27. N 24. P. 3201–3208.
92. Shuttleworth G., Eckery D.C., Awram P. Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice // *Arch. Virol.* Vol. 150. N 2. P. 341–349.
93. Tan M., Huang P., Xia M., Fang P.A., Zhong W., McNeal M., Wei C., Jiang W., Jiang X. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production // *J. Virol.* 2011. Vol. 85. N 2. P. 753–764.
94. Wang L., Xia M., Huang P., Fang H., Cao D., Meng X., McNeal M., Jiang X., Tan M. Branched-linear and agglomerate protein polymers as vaccine platforms // *Biomaterials.* 2014. Vol. 35. N 29. P. 8427–8438.
95. Tekewe A., Fan Y., Tan E., Middelberg A.P., Lua L.H. Integrated molecular and bioprocess engineering for bacterially produced immunogenic modular virus-like particle vac-

cine displaying 18 kDa rotavirus antigen // *Biotechnol. Bioeng.* 2017. Vol. 114. N 2. P. 397–406.

96. Choi A.H., McNeal M.M., Flint J.A., Basu M., Lycke N.Y., Clements J.D., Bean J.A., Davis H.L., McCluskie M.J., Van-Cott J.L., Ward R.L. The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant // *Vaccine*. 2007. Vol. 20. N 13–14. P. 1733–1740.

97. McNeal M.M., Basu M., Bean J.A., Clements J.D., Lycke N.Y., Ramne A., Löwenadler B., Choi A.H., Ward R.L. Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G), or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge // *Vaccine*. 2002. Vol. 25. N 33. P. 6224–6231.

98. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции

на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 // *Мед. иммунол.* 2016. Т. 18. № 5. С 417–424.

99. Fix A.D., Harro C., McNeal M., Dally L., Flores J., Robertson G., Boslego J.W., Cryz S. Safety and immunogenicity of a parenterally administered rotavirus VP8 subunit vaccine in healthy adults // *Vaccine*. 2015. Vol. 33. N 31. P. 3766–3772.

100. Groome M.J., Koen A., Fix A., Page N., Jose L., Madhi S.A., McNeal M., Dally L., Cho I., Power M., Flores J., Cryz S. Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet Infect. Dis.* 2017. Vol. 17. N 8. P. 843–853.

Поступила в редакцию
17.07. 2017 г.

Принята к печати
07.09.2017 г.

VIROLOGY

ROTAVIRUS VACCINES: NEW STRATEGIES AND APPROACHES

O.A. Kondakova*, N.A. Nikitin, E.A. Trifonova, J.G. Atabekov, O.V. Karpova

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

**e-mail: olgakond1@yandex.ru*

Rotavirus infection is a rotavirus-associated disease. It is the main cause of severe diarrhea among children all over the world and one of the factors influencing the infant mortality. Today, only live attenuated vaccines are widely used for vaccination against rotavirus infection. Existing vaccines have demonstrated their effectiveness, but they have a number of side effects, primarily the risk of intussusception. Complications associated with the use of existing vaccines are usually associated with oral administration of drugs and the replication of attenuated live vaccines in the human intestine. In this regard, there is a need to design modern, effective and safe vaccines against rotavirus infection, unable to reproduce (to replicate) in the human body. Currently, modern vaccines against rotavirus infection are being developed and tested actively. These are recombinant vaccines with parenteral administration. The complicated antigenic structure of rotavirus is one of the main problems for the design of such recombinant vaccines. This review discusses the genetic and antigenic diversity of rotavirus strains and the geographical location of their epidemically significant variants. The role of capsid proteins in the formation of an immune response to the virus and the current state of development of new candidate recombinant vaccines against rotavirus infection are considered.

Keywords: *rotavirus, vaccines, capsid protein, recombinant antigens, virus-like particles, adjuvant*

Сведения об авторах

Кондакова Ольга Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: olgakond1@yandex.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фито-вирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Трифорова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, академик РАН, гл. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.323

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ВИРУСОВ С ИКОСАЭДРИЧЕСКИМ И СПИРАЛЬНЫМ ТИПОМ СИММЕТРИИ

Е.А. Трифонова*, Н.А. Никитин, М.В. Архипенко,
Е.К. Донченко, И.Г. Атабеков, О.В. Карпова

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

*trifonova@mail.bio.msu.ru

Изучение возможностей модификации и структурной перестройки вирионов и вирусных белков — важная задача современной молекулярной вирусологии. Ранее в нашей лаборатории был разработан метод термической обработки палочковидного вируса табачной мозаики, позволяющий получить структурно модифицированные частицы сферической формы, состоящие из вирусного белка оболочки. Такие частицы обладали уникальными адсорбционными и иммуногенными свойствами и были успешно нами использованы для создания новой кандидатной вакцины против вируса краснухи. Позднее мы продемонстрировали возможность термической перестройки нитевидных вирионов Х-вируса картофеля. Настоящая работа посвящена сравнительному изучению термической перестройки вирусов с различной структурой, относящихся к разным таксономическим группам. Показано образование структурно модифицированных частиц сферической формы при термической обработке палочковидных вирионов со спиральным типом симметрии (вирус мозаики долихоса, вирус штриховатой мозаики ячменя). Выявлена зависимость размеров сферических частиц, образующихся из вируса мозаики долихоса, от исходной концентрации вируса. Изучена возможность термической перестройки нитевидных вирионов и вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры. При термической обработке вирусов растений с икосаэдрическим типом симметрии морфологических изменений обнаружено не было.

Ключевые слова: вирусы растений, спиральные вирусы, икосаэдрические вирусы, термическая перестройка вирусов, структурно модифицированные вирусные частицы, сферические частицы

Термическая обработка палочковидных вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ, род *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*) при 94°C приводит к перестройке вирусного белка оболочки (БО) и к формированию структурно модифицированных частиц сферической формы (сферические частицы — СЧ) [1]. СЧ, в отличие от нативного вируса, не содержат вирусную РНК и биodeградируемы. Показано, что СЧ обладают свойствами эффективного адъюванта и способны неспецифически адсорбировать на своей поверхности различные белковые молекулы. Обнаружено, что СЧ могут быть получены из различных форм БО, не содержащих генетический материал вируса, в том числе из препаратов А-белка и мономерной формы БО ВТМ [1–6]. Изменяя исходную концентрацию вирусного препарата, можно получать СЧ с размером от 50 нм до более 1 мкм [1, 6]. СЧ имеют огромный потенциал для разработки новых биотехнологий [7–10]. Недавно на основе СЧ и рекомбинантного антигена вируса краснухи была получена и исследована новая кандидатная вакцина против краснухи [11].

В 2016 г. нами были опубликованы данные, свидетельствующие о возможности термической перестройки другого фитовируса со спиральным типом симметрии (Х-вирус картофеля (ХВК), род *Potexvirus*, семейство *Alphaflexiviridae*) [12]. В отличие от ВТМ, вирионы ХВК — это гибкие нитевидные частицы [13]. Образование СЧ ХВК начинается при температуре 70°C и полностью завершается при 90°C. Таким образом, было показано, что термическая перестройка ХВК требует более низких температур обработки по сравнению с ВТМ. Размеры СЧ ХВК варьируют в диапазоне от 35 до 121 нм и, в отличие от размеров СЧ ВТМ, строго не зависят от начальной концентрации вирусного препарата [12].

В настоящей работе была изучена возможность получения структурно модифицированных частиц при термической перестройке вирионов икосаэдрических и спиральных вирусов, относящихся к различным таксономическим группам. В качестве представителей вирусов с палочковидными вирионами и спиральным типом симметрии были выбраны

вирус мозаики долихоса (вирус кроталирии индийской) (ВМД), представитель рода *Tobamovirus* семейства *Virgaviridae* [14]; вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), представитель рода *Hordeivirus* семейства *Virgaviridae* [15]. Также были использованы нитевидные вирионы и вирусоподобные частицы вируса мозаики альтернантеры (ВМАлт, представитель рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae*) [16]. Вирусы с икосаэдрическим типом симметрии были представлены вирусом мягкой мозаики фасоли (ВММФ) семейства *Tombusviridae* [17], а также вирусом мозаики цветной капусты (ВМЦК) рода *Caulimavirus* семейства *Caulimaviridae* [18].

Материалы и методы

ВМД, ВШМЯ, ВМАлт, ВММФ и ВМЦК были накоплены в растениях, выделены и очищены, как описано ранее [15–17, 19, 20].

Термическая обработка препаратов проводилась согласно протоколам, разработанным для ВТМ и ХВК при использовании термоциклера Терцик (ДНК-Технология, Россия) [1, 6, 12].

БО ВМАлт был получен с помощью метода солевой депротеинизации в присутствии 2 М LiCl (Amresco, США). Вирусоподобные частицы (ВПЧ) ВМАлт были получены при инкубации в воде высокого качества (Milli-Q, система Simplicity UV, Merck Millipore, США).

Приготовление образцов для электронной микроскопии (ЭМ) проводили в соответствии с ранее описанными методиками [1, 20]. Препараты исследовали с помощью электронных микроскопов JEM-1011 (JEOL, Япония), JEM-1400 (JEOL, Япония) и LEO-912AB (LEO, Германия).

Результаты и обсуждение

Ранее мы показали, что температурная обработка ВТМ и ХВК позволяет получить новый вид уникальных платформ-носителей. Продемонстрированы перспективы применения платформ на основе структурно модифицированных СЧ ВТМ при получении биологически активных комплексов, в частности, кандидатных вакцин и биоконтрастов [10, 11]. В настоящей работе явление термической перестройки было изучено у фитовирусов с различной морфологией вирионов (палочковидные, нитевидные, сферические).

Термическая перестройка вирусов с палочковидными вирионами была изучена на примере ВМД и ВШМЯ. ВМД – родственник ВТМ и, как все представители рода *Tobamovirus*, обладает сходными с ВТМ параметрами спирали и структурой [21]. Однако в отличие от ВТМ, у которого основными хозяевами являются представители семейства *Solanaceae*, ВМД поражает в основном зернобобовые культуры. Палочковидные вирионы ВМД имеют длину 300 нм и диаметр 17 нм (рисунок, А) [14]. Препараты ВМД неоднородны по длине и содержат

короткие вирионы (около 40 нм), несущие в своем составе субгеномные РНК [14, 22]. Данная особенность является важным отличием ВМД от ВТМ. ВШМЯ – типичный представитель рода *Hordeivirus* (рисунок, Г). Ячмень (*Hordeum vulgare*) и пшеница (*Triticum aestivum*) являются природными хозяевами этого вируса. Геном ВШМЯ (штамм ND 18) разделен на 3 молекулы одноцепочечной РНК положительной полярности [23]. Сегменты распределены по разным жестким палочковидным вирусным частицам со спиральным типом симметрии и длиной в диапазоне 110–150 нм. Недавно с помощью криоэлектронной микроскопии было продемонстрировано, что в составе препаратов ВШМЯ присутствуют вирионы с широким (22,4 нм) и узким диаметром (21,6 нм) [15]. Выдвинуто предположение, что такие вирионы являются конформационными формами ВШМЯ. Таким образом, структура ВШМЯ более лабильна и гетерогенна, чем структура представителей рода *Tobamovirus* [15, 24]. Термическую обработку палочковидных вирусов проводили по методике, отработанной ранее для ВТМ [1]. Продемонстрировано, что при термической обработке ВМД (рисунок, Б и В) и ВШМЯ (рисунок, Д и Е) при 94°C образуются СЧ. Как и в случае с ВТМ, процесс образования СЧ из ВМД и ВШМЯ является двухстадийным. На первой стадии при нагревании вируса до 90°C происходит сворачивание вириона с одного или двух концов и образование промежуточной формы (данные не приводятся). Последующее повышение температуры до 94°C приводит к 100%-ному преобразованию промежуточных форм в СЧ. Дальнейшее нагревание препаратов и увеличение температуры инкубации от 94°C до 98°C не приводило к видимым изменениям размеров или морфологии СЧ. При термической обработке ВМД и ВШМЯ при 70°C морфологических изменений вирионов отмечено не было. Таким образом, продемонстрировано, что термическая перестройка не только ВТМ, но и других палочковидных вирусов происходит при 94°C, а не при более низкой температуре, как у нитевидного ХВК (90°C). С помощью ЭМ были проанализированы СЧ, образующиеся при 94°C из препаратов ВМД с концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл. Полученные микрофотографии были обработаны с помощью программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США), которая позволила рассчитать средний диаметр СЧ. У ВМД он составил 60 ± 8 , 310 ± 15 , 690 ± 60 нм для концентраций 0,1, 1 и 10 мг/мл, соответственно. Таким образом, было обнаружено, что размеры СЧ ВМД зависят от исходной концентрации препарата вируса. Полученная зависимость была аналогична зависимости, обнаруженной ранее для ВТМ [1], что можно объяснить их сходными структурными характеристиками. Для ВШМЯ было показано, что из вируса с концентрацией 0,1 мг/мл образуются СЧ ВШМЯ со средним диаметром 265 ± 18 нм, а при концентрации 1 мг/мл образуются СЧ ВШМЯ со

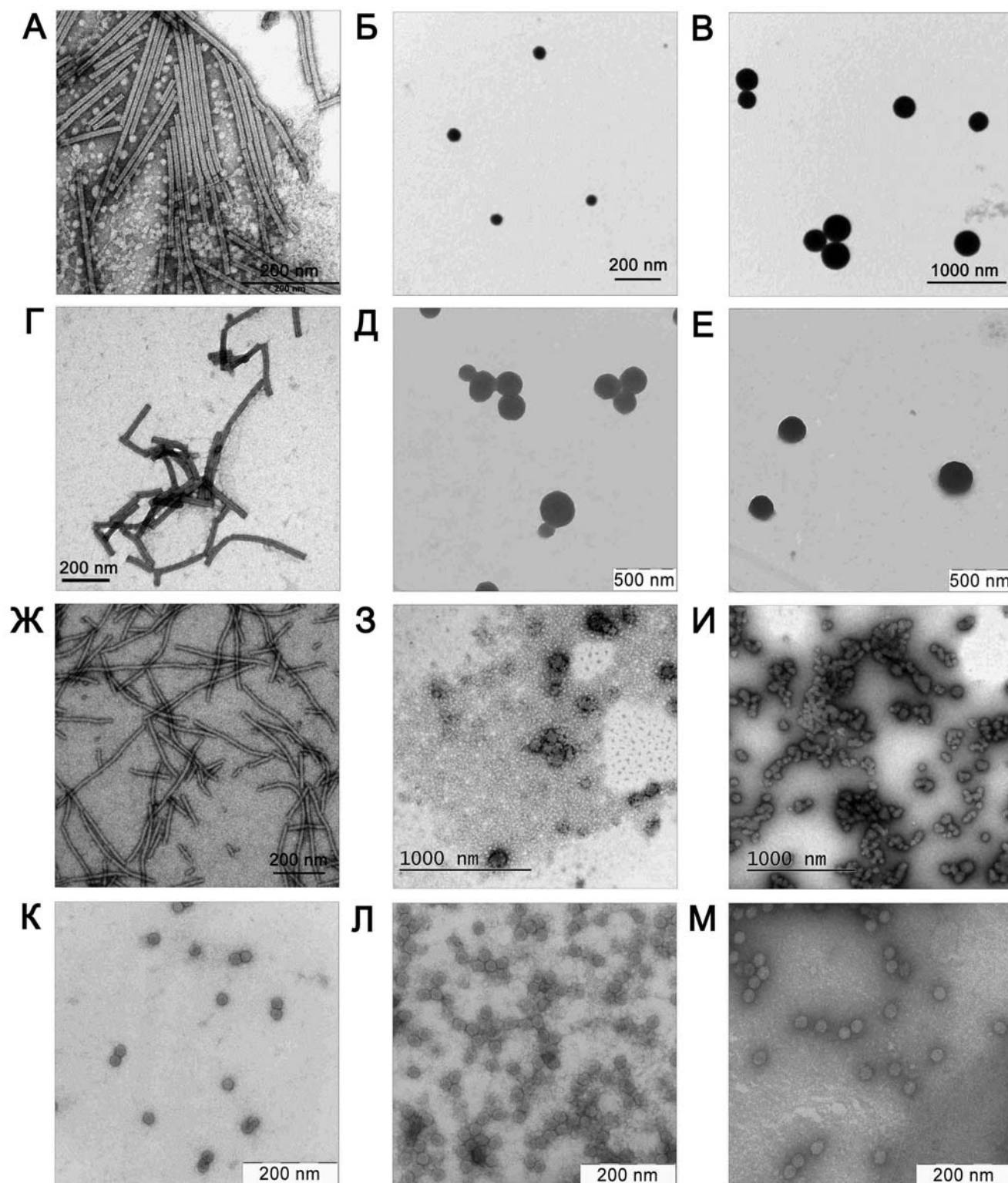


Рисунок. Результаты термической обработки вирусов растений с различной структурой. А – вирус мозаики долихоса (контроль); Б, В – сферические частицы, полученные при нагревании (94°C) препарата вируса мозаики долихоса с исходной концентрацией 0,1 мг/мл и 1 мг/мл. Г – вирус штриховатой мозаики ячменя (контроль). Д, Е – сферические частицы, полученные при нагревании (94°C) препарата вируса штриховатой мозаики ячменя с исходной концентрацией 0,1 мг/мл и 1 мг/мл. Ж – вирусоподобные частицы вируса мозаики альтернантеры (контроль). З, И – сферические частицы, полученные при нагревании (90°C) вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры с исходной концентрацией препарата 0,1 мг/мл и 1 мг/мл. К – вирус мягкой мозаики фасоли (контроль). Л, М – вирус мягкой мозаики фасоли, проинкубированный при температуре 98°C в течение 10 или 30 с. Просвечивающая электронная микроскопия, окрашивание 2%-ным уранилацетатом

средним диаметром 280 ± 16 нм. Дальнейшее повышение концентрации ВШМЯ не приводило к значимому увеличению размеров образующихся СЧ. Следовательно, в случае с СЧ ВШМЯ строгая зависимость размеров частиц от исходной концентрации вируса не выявлена. Можно предположить, что это связано с гораздо большей гетерогенностью препарата ВШМЯ по сравнению с ВМД, причем не только по длине, но и по диаметру вирусных частиц.

На следующем этапе работы была исследована возможность термической перестройки вируса с нитевидными вирионами, ВМАльт. ВМАльт – представитель рода *Potexvirus* и родственник ХВК. Вирионы ВМАльт имеют длину 570 нм и диаметр 13 нм [16]. Они по своим свойствам и размерам близки к ХВК, и можно было ожидать, что при их нагревании будут получены частицы, аналогичные СЧ ХВК. К нашему удивлению, при термической денатурации ВМАльт в условиях образования СЧ из ХВК [12] наблюдалось образование структур неправильной формы, склонных к агрегации (данные не представлены). Дальнейшее повышение температуры не приводило к каким-либо изменениям. Ранее в нашей лаборатории было показано, что БО ВМАльт, в отличие от БО ХВК, способен формировать ВПЧ *in vitro* в отсутствие РНК [16]. В настоящей работе для термической обработки были использованы ВПЧ ВМАльт (рисунок, Ж), сходные по длине с нативным вирусом (средняя длина ВПЧ – 500 нм, диаметр 13 нм). При термической

обработке ВПЧ ВМАльт с исходной концентрацией 0,1 и 1 мг/мл происходило образование СЧ с формой, близкой к сферической, и диаметром около 100 нм (рисунок, 3 и И). Зависимости размеров образующихся СЧ от исходной концентрации ВПЧ обнаружено не было.

Возможность термической модификации вирусов с икосаэдрическим типом симметрии была изучена на примере сферических вирионов ВМЦК (ДНК-содержащий вирус) и ВММФ (РНК-содержащий вирус, геном положительной полярности) (рисунок, К). При нагревании препаратов ВММФ до $94\text{--}98^\circ\text{C}$ структурная модификация не происходила, вирус сохранял свою морфологию и размеры. Изменение времени прогревания с 10 (рисунок, Л) до 30 с (рисунок, М) также не приводило к изменениям вирионов. Аналогичные результаты были получены для ВМЦК (данные не представлены). Вероятно, БО вируса, организованные в икосаэдр, обладают большей устойчивостью к термической денатурации.

Авторы выражают благодарность д.б.н. С.Н. Чиркову за помощь в получении ВММФ. Работа с ВМД, ВШМЯ, ВМЦК, ВММФ выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-00208 мол_а). Исследования термической перестройки ВМАльт, получение вирусоподобных частиц ВМАльт и их термоденатурация выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // J. Gen. Virol. 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.
2. Nikitin N.A., Malinin A.S., Rakhnyanskaya A.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Yaroslavov A.A., Atabekov J.G. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // Polym. Sci. Ser. A. 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.
3. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platform and foreign antigens // J. Gen. Virol. 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.
4. Dobrov E.N., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Parshina E. Yu., Makarov V.V., Maksimov G.V., Karpova O.V., Atabekov J.G. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 5. P. 701–708.
5. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 8. P. 1193–1201.
6. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Obtaining and characterization of spherical particles – new biogenic platforms // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N. 4. P. 194–197.
7. Atabekov J.G., Nikitin N.A., Karpova O.V. New type of platforms for *in vitro* vaccine assembly // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 4. P. 177–183.
8. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis // Microsc. Microanal. 2013. Vol. 19. N 4. P. 808–813.
9. Nikitin N.A., Malinin A.S., Trifonova E.A., Rakhnyanskaya A.A., Yaroslavov A.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations // J. Biomat. Sci. Polym. Ed. 2014. Vol. 25. N 16. P. 1743–1754.
10. Bruckman M.A., Czapar A.E., VanMeter A., Randolph L.N., Steinmetz N.F. Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer // J. Control. Release. 2016. Vol. 231. P. 103–113.
11. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // Antiviral Res. 2017. Vol. 144. P. 27–33.
12. Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions // FEBS Lett. 2016. Vol. 590. N 10. P. 1543–1551.

13. Atabekov J., Dobrov E., Karpova O., Rodionova N. Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution // *Mol. Plant Pathol.* 2007. Vol. 8. N 5. P. 667–675.
14. Descriptions of Plant Viruses (DPV) [Электронный ресурс]. 1975. Дата обновления: 08.2013. URL: <http://www.dpvweb.net/> (дата обращения: 16.07.2017).
15. Clare D.K., Pechnikova E.V., Skurat E.V., Makarov V.V., Sokolova O.S., Solovyev A.G., Orlova E.V. Novel inter-subunit contacts in barley stripe mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy // *Structure*. 2015. Vol. 23. N 10. P. 1815–1826.
16. Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Characterization of Alternanthera mosaic virus and its coat protein // *Open Virol. J.* 2011. Vol. 5. P. 136–140.
17. Karasev A.V., Chirkov S.N., Kaftanova A.S., Miroshnichenko N.A., Surgucheva N.A., Fedotina V.L. Characterization of bean mild mosaic virus: particle morphology, composition and RNA cell-free translation // *Intervirology*. 1989. Vol. 30. N 5. P. 285–293.
18. Yasaka R., Nguyen H.D., Simon Y.W.H., Duchêne S., Korkmaz S., Katis N., Takahashi H., Gibbs A.J., Ohshima K. The temporal evolution and global spread of cauliflower mosaic virus a plant pararetrovirus // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 1. e85641.
19. Kassanis B., McCarthy D. The quality of virus as affected by the ambient temperature // *J. Gen. Virol.* 1967. Vol. 1. N 4. P. 425–440.
20. Nikitin N., Trifonova E., Evtushenko E., Kirpichnikov M., Atabekov J., Karpova O. Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. N 11. e0142415.
21. Stubbs G., Parker L., Junn J., Kendall A. Flexible filamentous virus structures from fiber diffraction // *Fibre Diffraction Rev.* 2005. Vol. 13. N 2. P. 38–42.
22. Silver S., Quan S., Deom M. Completion of the nucleotide sequence of sunn-hemp mosaic virus: a tobamovirus pathogenic to legumes // *Virus Genes*. 1996. Vol. 13. N 1. P. 83–85.
23. Hafez E.E., Abdel Aleem E.E., Fattouh F.A. Comparison of barley stripe mosaic virus strains // *Z. Naturforsch C*. 2008. Vol. 63. N 3–4. P. 271–276.
24. Solovyev A.G., Makarov V.V. Helical capsids of plant viruses: architecture with structural lability // *J. Gen. Virol.* 2016. Vol. 97. N 8. P. 1739–1754.

Поступила в редакцию
30.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

VIROLOGY

COMPARATIVE STUDY OF THE THERMAL REMODELLING OF VIRUSES WITH ICOSAEDRAL AND HELICAL SYMMETRY

E.A. Trifonova, N.A. Nikitin, M.V. Arkhipenko, E.K. Donchenko, J.G. Atabekov, O.V. Karpova*

*Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
trifonova@mail.bio.msu.ru

Study of the possibilities of virions and viral proteins modifications and structural remodeling is an important problem of the modern molecular virology. The method of thermal transformation of tobacco mosaic virus rod-like virions in structurally modified spherical particles, consisting of viral coat protein, was developed in our laboratory. These particles have unique adsorption and immunogenic properties. We developed a new candidate vaccine against rubella virus based on structurally modified spherical particles. Later we demonstrated the possibility of thermal remodeling of potato virus X filamentous virions. The present work is devoted to a comparative study of the thermal remodeling of viruses with different structure, belonging to various taxonomic groups. The formation of structurally modified spherical particles was shown during thermal treatment of rod-like virions with a helical symmetry (dolichos enation mosaic virus, barley stripe mosaic virus). The dependence of the sizes of the spherical particles (formed from dolichos enation mosaic virus) on the initial concentration of the virus was revealed. The process of thermal remodeling of alternanthera mosaic virus filamentous virions and virus-like particles was studied. Morphological changes of plant viruses with icosahedral symmetry were not observed during thermal treatment.

Keywords: *plant viruses, helical viruses, icosahedral viruses, thermal remodeling of viruses, structural modified virus particles, spherical particles*

Сведения об авторах

Трифорова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Архипенко Марина Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: armar74@mail.ru

Донченко Екатерина Кирилловна — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: donchenko@mail.bio.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, академик, гл. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

БИОФИЗИКА

УДК 574.5+577.355

ОТБОР ВИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ В СОСТАВ ЛАБОРАТОРНОГО АЛЬГОЦЕНОЗА ПО ИХ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКИМ И БИОФИЗИЧЕСКИМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ

П.В. Фурсова*, Е.Н. Воронова, А.П. Левич, Д.В. Рисник, С.И. Погосян

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

*e-mail: fursova@biophys.msu.ru

Биоиндикаторами состояния водных систем могут служить различные характеристики сообществ фитопланктона. Для создания модели природной экосистемы, которая позволит проводить многофакторные эксперименты по влиянию физико-химических факторов на биофизические и гидробиологические характеристики фитопланктона, необходим подбор соответствующих видов микроводорослей. Проведенное исследование позволило из имеющихся в музее видов выбрать шесть для создания модельного альгоценоза. Было установлено, что для оптимального роста всех этих видов необходимы схожие условия эксперимента (световой и температурный режимы, содержание элементов питания). В качестве базовой среды предложено использовать среду с пониженным содержанием азота. В таких условиях клетки микроводорослей нормально функционируют и делятся, при этом длительность достижения стационарной стадии роста (10–15 сут), на которой завершают эксперимент, позволяет проводить большое число таких экспериментов с минимальными затратами времени. Клетки отобранных видов обладают морфологическими различиями, достаточными для автоматизированной идентификации их в поликультуре. Получены геометрические характеристики клеток для компьютерного подсчета численности каждого вида сообщества по микрофотографиям.

Ключевые слова: фитопланктон, лабораторный альгоценоз, флуоресценция, безазотная среда, морфология клеток, численность клеток, световая кривая

Состав и функциональное состояние сообществ фитопланктона являются одними из наиболее распространенных биоиндикаторов для оценки благополучия водных экосистем. Это обусловлено тем, что клетки микроводорослей быстро реагируют на изменение качества водной среды. При этом они составляют основу пищевой цепи и, следовательно, оказывают влияние на состояние всех трофических уровней. В качестве биоиндикационных гидробиологических показателей могут выступать численность или биомасса (абсолютные или относительные) индикаторных видов или отделов водорослей; индексы сапробности; показатели разнообразия (в частности, параметры ранговых распределений) и доминирования; размерные характеристики сообщества — средний объем клеток, площадь поверхности клеток, соотношение численности или биомассы клеток в размерных классах [1, 2]. Определение гидробиологических показателей требует длительного времени обработки проб и большого труда высококвалифицированных альгологов. По этой причине более перспективны биофизические индикаторные показатели состояния фитопланктона, характеризующие фундаментальные процессы фотосинтеза [3–6]. Современные приборы способны измерять эти показатели с высокой точностью в режиме реального времени. Такие измерения легко могут быть компьютеризованы.

Кроме того, с помощью специализированного программного обеспечения возможна автоматизация подсчета численности клеток видов. Однако для корректной работы таких программ необходимо подобрать виды, которые хорошо отличаются друг от друга визуально. При этом колониальные формы не должны мешать подсчету численности и определению размеров отдельных клеток. В нашем музее культур по этому критерию наиболее подходящими видами являются *Anabaena variabilis*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella sorokiniana*, *Pleurochloris magna* и *Stichococcus bacillaris*.

Существование многих биоиндикационных показателей создает методическую проблему выбора среди них наиболее адекватных целям оценки состояния экосистем. Вместе с тем, для любого выбранного показателя возникает проблема установления областей значений, соответствующих благополучным и неблагополучным состояниям биотического компонента экосистемы. Проблема поиска границ области благополучия (границ нормы) имеет два аспекта. Первый — содержательный — выяснение того, “что такое хорошо и что такое плохо” в экосистемах. Второй аспект — методико-вычислительный. Задачу установления границ нормы тем или иным образом решают в однофакторных экспериментах по изучению зависимостей “доза-эффект”, когда на тест-объект влияет единственный фак-

тор, остальные же находятся в оптимальных диапазонах. В природных объектах на биоту одновременно влияет множество факторов среды, каждый из которых, как и их взаимодействие, потенциально способен приводить к экологическому неблагополучию. В силу этого зависимость биоиндикационного показателя от каждого из факторов в отдельности (зависимость “доза-эффект”) приобретает “размытый”, неоднозначный характер. Это обстоятельство обуславливает малую эффективность привычных методов анализа зависимостей между биотическими и физико-химическими характеристиками и вызывает необходимость выработки новых подходов к анализу данных с нефункциональной зависимостью.

Для разработки методов, решающих перечисленные проблемы, необходимо создание лабораторного альгоценоза. Такая модель природного сообщества позволит проводить эксперименты по одновременному влиянию нескольких физико-химических факторов на биофизические и гидробиологические характеристики фитопланктона и определять границы области благополучного состояния экосистемы.

Целью представленного в работе исследования стал подбор видов для модельного альгоценоза, удовлетворяющих следующим критериям: способность к росту в условиях лабораторного термостатированного люминостата на выбранной для эксперимента среде; совместимость видов при культивировании в поликультуре; возможность идентификации клеток разных видов при помощи программы распознавания образов и возможность фиксировать различия клеток разных видов в поликультуре для автоматизации измерений численности и размеров клеток в пробах.

Материалы и методы

Объектами экспериментов стали следующие виды из музея культур, созданного для подбора компонентов альгоценоза:

Зеленые водоросли: *Ankistrodesmus acicularis* (A.Br.) Korsch; *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs; *Chlorella ellipsoidea* Gern.; *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss; *Chlorococcum minutum* Starr; *Coelastrum astroideum* De Notaris; *Coelastrum morus* W. West & G.S. West; *Dictyosphaerium pulchellum* Wood; *Dispora crucigenoides* Printz; *Haematococcus* sp.; *Kirchneriella obesa* (West) Schmidle; *Kirchneriella subsolatoria* G.S. West; *Pediastrum* sp.; *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kutz; *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.; *Scenedesmus* sp.; *Scotiella nivalis* (Schutt.) Fritsch; *Sorastrum* sp.; *Stichococcus bacillaris* Nag; *Tetradron caudatum* (Corda) Hansgirg; *Tetradron minimum* (A.C.Broun) Hansgirg; *Trebouxia* sp.

Охрофитовые водоросли: *Botrydium cystosum* Vischer; *Pleurochloris magna* Boye-Pet.

Цианобактерии: *Amorphonostoc* sp.; *Anabaena variabilis*; *Chroococcidiopsis* sp.; *Chroococcus globulus*; *Colo-*

thrix elenkinii Kossinsk; *Synechococcus* sp. PCC 7942; *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT.

Культивирование водорослей. В качестве базовой среды для опытов использовали модифицированную для работы с пресноводными видами среду BG11 с добавками микроэлементов [7]. В части опытов варьировали содержание азота: использовали либо безазотную среду, либо среду с 5% или 10% азота от стандартного уровня (1,5 г/л NaNO_3). Одну серию экспериментов проводили на безфосфорной среде. Финальное значение pH приготовленной среды — 7,4. Культивирование происходило на качалке в люминостате при температуре 21°C в режиме непрерывного освещения при интенсивности света 70 мкмоль квантов/м²с. При культивировании поддерживали альгологическую чистоту культур. Культивирование проводили в накопительном режиме, питательные компоненты добавляли только при составлении среды. Стадии роста и достижение стационарной фазы контролировали по содержанию хлорофилла спектрофотометрическим методом. Колбы с культурами располагали на качалках для равномерного перемешивания суспензии. Объем колб — 100 мл (около 45 мл среды). Перед инокуляцией клетки отмывали от питательных веществ. Суспензии каждого вида водорослей разводили до достижения показателя абсорбции на длине волны 678 нм, равного 0,04. Серии проведенных опытов представлены в табл. 1.

Показатели флуоресценции хлорофилла в суспензии водорослей измеряли на флуориметре с амплитудной модуляцией возбуждающего света “Мега 25”, созданном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова [8]. Измерения проводили после предварительной 15-минутной темновой адаптации водорослей. Интенсивность флуоресценции измеряли при помощи электронного фотоумножителя через фильтр КС-18, пропускающий излучение с длиной волны более 680 нм. Возбуждение флуоресценции проводили с помощью светодиодов, имеющих максимум излучения на длине волны 455 нм. Интенсивность флуоресценции хлорофилла в условиях открытых реакционных центров фотосистемы 2 (F_0) и максимальную интенсивность флуоресценции хлорофилла в условиях полностью закрытых реакционных центров фотосистемы 2 (F_m) измеряли при интенсивности возбуждающего света с плотностью 0,8 и 6000 мкмоль квантов/м²с, соответственно. Прибор позволяет проводить измерение в двух режимах — без подсветки и с подсветкой. Режим с подсветкой создает дополнительную нагрузку на фотосинтетический аппарат клетки, что позволяет вычислить скорость электронного транспорта. В работе использовали 7 уровней подсветки: 0; 10,3; 20,5; 41,0; 82,0; 164,1; 328,1 мкмоль/м²с. Измерения проведены согласно “Методике измерений обилия и индексации состояния фитопланктона флуоресцентным методом” [3, 9]. Методика аттестована: аттестат № 01.0025/205-66-11, ФР.1.39.2011.11246.

Таблица 1

Серии проведенных экспериментов с монокультурами

Серия №	Виды	N, %	P, %	Длительность эксперимента, сут
1	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Synechococcus</i> sp. 7942, <i>Stichococcus bacillaris</i>	100	100	38
2	<i>Pleurochloris magna</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	100	100	11
3	<i>Pleurochloris magna</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	10	100	11
4	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> , <i>Pleurochloris magna</i> , <i>Scotiella nivalis</i> , <i>Stichococcus bacillaris</i>	0	100	12–15
5	<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Trebouxia</i> sp., <i>Anabaena variabilis</i>	0	100	8–17
6	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> , <i>Pleurochloris magna</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Scotiella nivalis</i>	5	100	2–13
7	<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Trebouxia</i> sp., <i>Anabaena variabilis</i>	5	100	11–20
8	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Pleurochloris magna</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Anabaena variabilis</i>	100	0	22–35

Примечание: в столбцах N и P приведены величины начального содержания азота и фосфора в среде в процентах от величин их содержания в полной среде BG11.

Все измерения параметров флуоресценции при росте культур на безазотной и бесфосфорной среде, а также при разных уровнях подсветки проводили в трех повторностях.

Спектральные характеристики. Измерение спектров поглощения суспензий водорослей в диапазоне от 350 нм до 850 нм проводили на однолучевом спектрофотометре с интегрирующей сферой на базе спектрометра USB2000 (Ocean Optics, США). Спектр поглощения вычисляли на основании двух оптических спектров, полученных при установке кюветы с образцом на разных расстояниях от интегрирующей сферы, что позволяло определить рассеяние света на образце [10]. Допустимая погрешность измерения оптической плотности не превышает 0,005 при оптической плотности 1 во всем спектральном диапазоне.

На основе данных флуориметрии и спектрофотометрии для каждого эксперимента получили набор спектрально-оптических показателей состояния фитопланктона: D_{678} (коэффициент поглощения на длине волны 678 нм, пропорциональный плотности пигментов в культуре); R_{750} (коэффициент рассеяния на длине волны 750 нм, пропорциональный плотности клеток в культуре); F_0 ; F_m . Потенциальную эффективность первичных процессов фотосинтеза Y вычисляли по формуле: $Y = (F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$, где $F_v = F_m - F_0$ – переменная флуоресценция. Скорость транспорта электронов через фотосистему 2 (ETR – *electron transport rate*) при облучении объекта светом интенсивностью I_k рассчитывали как $ETR = I_k \cdot Y$.

В результате для методических экспериментов отобрали 10 видов: *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus quadricauda*, *Synechococcus* sp. 7942, *Pleurochloris magna*, *Scenedesmus obliquus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Scotiella nivalis*, *Trebouxia* sp., *Anabaena variabilis*, *Stichococcus bacillaris*. Для каждой из монокультур проводили измерения индукционных кривых флуоресценции и спектров поглощения света.

Численность клеток определяли прямым подсчетом в камере Горяева. Количество просчитываемых “квадратов” в камере зависело от плотности суспензии. В каждой пробе просчитывали от 100 до 500 клеток. Содержимое камеры Горяева фотографировали при помощи микроскопа Люмам (ЛОМО, Россия) с камерой DCM310 Microscope CMOS Camera (Китай). Фотографированию предшествовал период оседания клеток в камере (10 мин.), чтобы фокусировка микроскопа охватила слой, в который попали клетки из всего объема камеры. Для каждой пробы было сделано от 10 (на этапах, когда численность была высока) до 20 (на этапах, когда численность была мала) фотографий различных полей зрения. Площади поверхности клеток рассчитаны по средним размерам и геометрическим приближениям форм клеток (эллипсоиды, конусы, круговые цилиндры [11]).

Для автоматического подсчета клеток была выбрана программа Fiji [12], базирующаяся на программном обеспечении ImageJ 1.49f. Фотоснимки поля зрения камеры микроскопа передавались на монитор компьютера. Зеленый канал полученных цветных снимков, как наименее зашумленный и наиболее контрастный, преобразовывался в черно-белые изображения. Анализируя их, программа определяла численность и средние размеры клеток вида в монокультуре, считая, что черные области – это клетки или посторонний мусор, а все белые области – среда. Черные области, отвечающие характеристикам клеток вида, относили к клеткам, остальные области относили к частицам мусора.

Для получения корректных данных была необходима предварительная настройка программы для идентификации клеток различных видов, которую проводили по снимкам монокультур. В частности, применяли фильтры размытия либо увеличения резкости, алгоритмы разбиения колониальных форм на отдельные клетки и заполнения светлых внутри-

клеточных областей черным цветом (для правильного измерения площади, занимаемой клеткой на снимке).

Результаты и обсуждение

Предварительно все виды имеющихся в нашем распоряжении водорослей и цианобактерий были проверены на пригодность к росту в выбранных условиях культивирования и совместимость в поликультуре. Часть видов (виды родов *Coelastrum*, *Dictyosphaerium*, *Pediastrum*, *Sorastrum*, *Amorphonostoc*, *Colothrix*) образуют колонии или являются нитчатыми формами и не подходят для автоматизированного подсчета клеток. Виды родов *Dispora*, *Haematococcus*, *Botrydium* не образуют однородной суспензии при культивировании в жидкой среде, что существенно затрудняет измерения параметров

флуоресценции и спектров поглощения. Клетки части видов (родов *Chlorococcum*, *Kirchneriella*, *Tetradraedron*, *Chroococcus*, *Chroococcidiopsis*) при культивировании в поликультуре неудовлетворительно распознаются при автоматическом подсчете с помощью компьютерной программы.

Работа со снимками клеток в монокультурах дала возможность получить значения параметров, которые позволят при дальнейшей работе с альгоценозами распознавать и подсчитывать клетки разных видов (табл. 2).

Виды, отобранные по морфологическим признакам, демонстрируют удовлетворительный рост на базовой среде BG11 (рис. 1).

Измерение параметров флуоресценции в процессе культивирования позволило рассчитать *ETR* при облучении водорослей светом различной интенсивности (рис. 2). В соответствии с получен-

Таблица 2

Параметры работы программы Fiji, необходимые для распознавания клеток различных видов при микроскопическом анализе

Вид	Площадь клетки, мкм ²	“Circularity” – близость формы границы клетки к кругу
<i>Anabaena variabilis</i>	6,5–29	0,60–1,00
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	7,2–110	0,00–0,75
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	21–220	0,10–0,80
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,7–17,9	0,70–1,00
<i>Pleurochloris magna</i>	18–110	0,70–1,00
<i>Stichococcus bacillaris</i>	5–25	0,50–0,90

Примечание: если проекция клетки на фотографии не имеет ничего общего с кругом, например, представляет из себя правильный прямоугольник, – показатель равен 0, если проекция клетки выглядит как правильный круг, показатель равен 1.

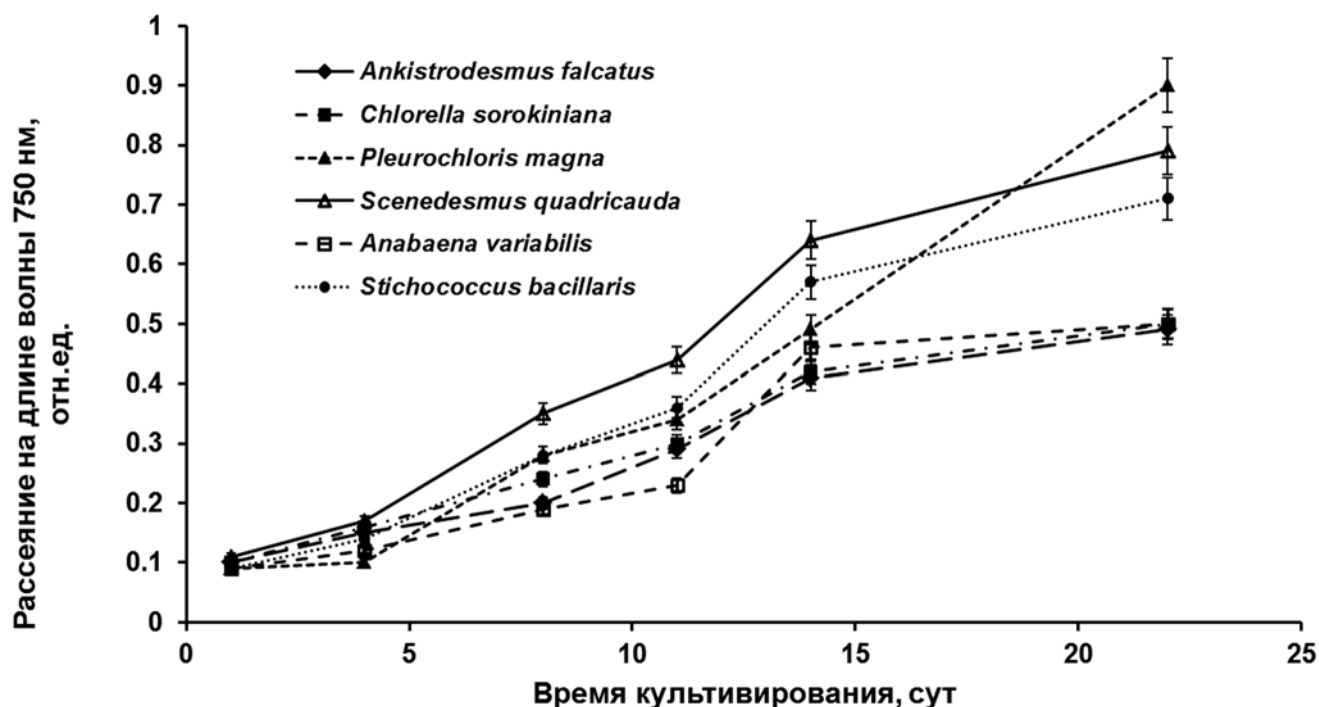


Рис. 1. Изменение значений рассеяния на длине волны 750 нм (R_{750}) в суспензии клеток микроводорослей в процессе роста монокультур на полной среде BG11

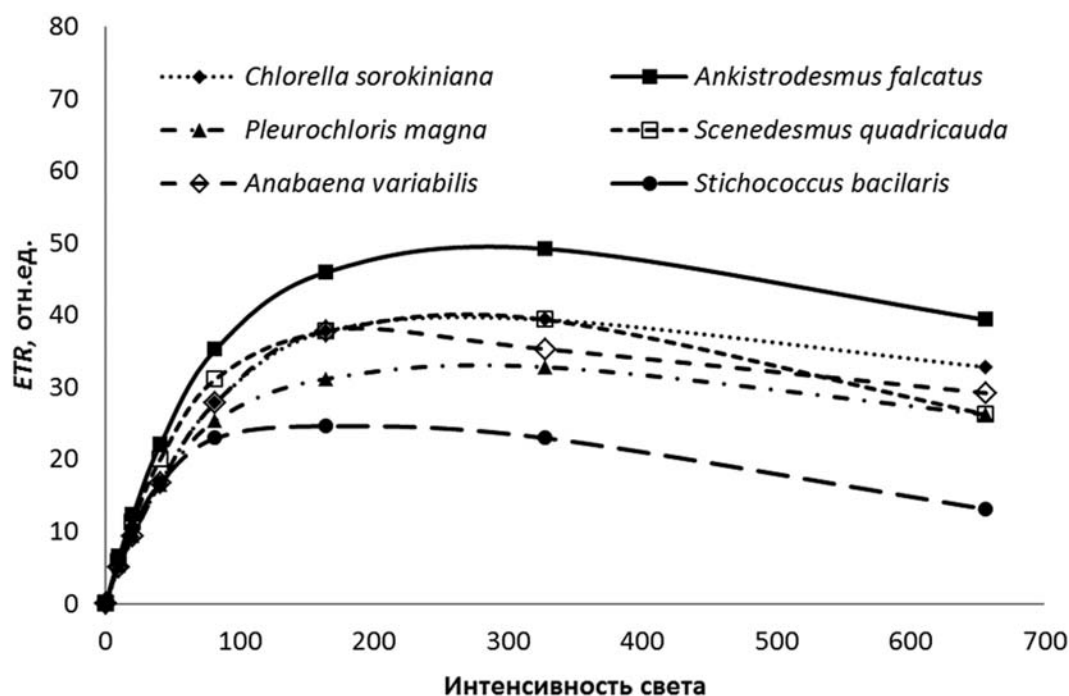


Рис. 2. Зависимость величины скорости электронного транспорта (ETR) от освещенности при культивировании монокультур на полной среде BG11

ными световыми кривыми (зависимостями ETR от интенсивности освещения) представляется целесообразным использовать освещенность в 70 мкмоль квантов/м²с.

Процесс “потребление-рост” у фитопланктона проходит в несколько дискретных стадий [13]:

- потребление питательных веществ без деления клеток, т.е. создание внутриклеточных запасов веществ;

- потребление веществ из среды и деление клеток пропорционально количеству потребленного вещества до истощения вещества в среде;

- деление клеток за счет внутриклеточных запасов, пока их содержание не сократится до некоторой видоспецифической величины минимальной клеточной квоты.

Последняя стадия имеет место в основном за счет внутриклеточных запасов азота и фосфора, которые достаточно существенны: нерастраченных запасов азота хватает на несколько делений клеток без потребления азота из среды, а запасов фосфора — на несколько десятков делений [13]. Указанное обстоятельство приводит к тому, что при накопительном культивировании на полной среде BG11 стационарная стадия бывает достигнута (в первую очередь за счет контактного торможения деления) через много недель после инокуляции клеток. Так, эксперименты по выращиванию монокультур *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus quadricauda*, *Sinechococcus* sp. 7942 на полной среде BG11 длились 38 сут (табл. 1).

Для сокращения сроков эксперимента была применена методика истощения минерального питания при культивировании монокультур и выращивания на обеднённых по питательным веществам

средах. Истощение состоит в выращивании на безфосфорной или безазотной среде до истощения внутриклеточных запасов. Культивирование на обеднённой среде приводит к меньшему (по сравнению с ситуацией на полной среде) сроку достижения стационарной стадии. Например, монокультура *Chlorella sorokiniana* достигает стационарной стадии на безазотной среде за 7 сут, на среде с содержанием азота, уменьшенным в 20 раз по отношению к полному, — в среднем за 13 сут, на безфосфорной — за 28 сут. Сокращение длительности эксперимента в дальнейшем позволит в более короткие сроки проводить серии исследований по изучению негативного воздействия различных факторов на состояние модельного альгоценоза.

Результаты культивирования показали, что отобранные виды можно выращивать как на безазотной (или обеднённой по азоту) среде, так и на безфосфорной. Предварительно истощенные клетки, с поверхности которых были отмыты абсорбированные биогенные элементы, после пересева на такие среды возобновляли рост, культура со временем достигала стационарной стадии. Отметим, что после истощения биогенных элементов в среде число делений клеток на внутриклеточных запасах азота существенно меньше, чем на внутриклеточных запасах фосфора. Так, длительность достижения стационарной стадии роста на безазотной и безфосфорной средах для *Ankistrodesmus falcatus* составила 8 и 22 сут, соответственно, для *Pleurochloris magna* — 10 и 25 сут. Поэтому использование в дальнейших опытах с модельным альгоценозом сред, обеднённых по азоту, а не фосфору, позволит сократить длительность каждого эксперимента.

Таким образом, проведенное исследование позволило из имеющихся в музее видов выбрать шесть

для создания модельного альгоценоза: *Ankistrodesmus falcatus*, *Anabaena variabilis*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus quadricauda*, *Pleurochloris magna*, *Stichococcus bacillaris*. В качестве базовой среды предложено использовать среду BG11 с пониженным содержанием азота.

Морфология клеток видов, отобранных для дальнейших опытов, позволяет автоматизировать идентификацию каждого из них в поликультуре. Для измерения численности и размеров клеток в моно- и поликультурах может быть использована программа распознавания образов Fiji.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bellinger E.G., Sigeo D.C. Freshwater algae: Identification and use as bioindicators. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 284 p.
2. Dokulil M.T. Algae as ecological bioindicators // Bioindicators & biomonitors: Principles, concepts, and applications / Eds. B.A. Markert, A.M. Breure, and H.G. Zechmeister. Oxford: Elsevier, 2003. P. 285–329.
3. Konyukhov I.V., Selina M.S., Morozova T.V., Pogosyan S.I. Experience of continuous fluorimetric monitoring of phytoplankton at a mooring station // Oceanology. 2012. Vol. 52. N 1. P. 130–140.
4. Falkowski P.G., Kolber Z. Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans // Plant Physiol. 1995. Vol. 22. N 2. P. 341–355.
5. Buschmann C. Photochemical and non-photochemical quenching coefficients of the chlorophyll fluorescence: comparison of variation and limits // Photosynthetica. 1999. Vol. 37. N 2. P. 217–224.
6. Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Luring C., Meyerhofer M., Hansen U.-P., Dau H. A fluorimetric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ // Photosynth. Res. 2002. Vol. 72. N 1. P. 39–53.
7. Allen M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates // J. Phycol. 1968. Vol. 4. N 1. P. 1–4.
8. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Применение флуориметра “МЕГА-25” для определения количества фитопланктона и оценки

Авторы благодарят сотрудников коллекции микроорганизмов лаборатории микробиологии СПбГУ (CALU), Института физиологии растений РАН, Института биологии внутренних вод РАН, а также кафедр биофизики и микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за любезно предоставленные для музея культуры. Кроме того, авторы признательны Е.С. Кузнецовой и П.А. Бобыреву за помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-02601).

состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. 2009. N 6. С. 34–40.

9. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О. В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла. М.: Макс-Пресс, 2010. 116 с.

10. Merzlyak M.N., Naqvi K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2000. Vol. 58. N 2. P. 123–129.

12. Sun J., Liu D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton // J. Plankton Res. 2003. Vol. 25. N 11. P. 1331–1346.

13. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // Nature Methods. 2012. Vol. 9. N 7. P. 676–682.

14. Левич А.П., Ревкова Н.В., Булгаков Н.Г. Процесс “потребление-рост” в культурах микроводорослей и потребности клеток в компонентах минерального питания // Экологический прогноз. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. С.132–139.

Поступила в редакцию
04.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

BIOPHYSICS

SELECTION OF SPECIES FOR THE LABORATORY ALGAL COMMUNITY BY THEIR HYDROBIOLOGICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERISTICS

P.V. Fursova*, E.N. Voronova, A.P. Levich, D.V. Risnik, S.I. Pogosyan

Department of Biophysics, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;
*e-mail: fursova@biophys.msu.ru

Phytoplankton communities can serve as bioindicators of water system condition. Model of the natural ecosystem can enable multivariate experiments on the effect of physical and chemical factors on biophysical and hydrobiological characteristics of phytoplankton. Creating of such a model requires selecting appropriate species of microalgae. This study has allowed for selecting six types from those available in museum to create a model algal community. We found that similar conditions are required for their optimal growth (light, temperature, medium nutrients supply). As a base medium it is proposed to use a medium with low nitrogen content. Under these conditions, the cells function in a proper way and the cultures show satisfactory growth, while

the duration of reaching the stationary stage of growth (10–15 days) allows to have more experiments for a limited time. Cells of selected species have morphological differences that are sufficient for the automated identification within the polyculture. We have obtained the geometric characteristics of cells for computer counting of each community species on microphotographs.

Keywords: *phytoplankton, algal community, fluorescence, nitrogen-free medium, cell morphology, cell number, light curve*

Сведения об авторах

Фурсова Полина Викторовна — канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: fursova@biophys.msu.ru

Воронова Елена Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vlena66@mail.ru

Левич Александр Петрович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-60; e-mail: apl@chronos.ru

Рисник Дмитрий Владимирович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-60; e-mail: biant3@mail.ru

Погосян Сергей Иосифович — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: pogosyan@biophys.msu.ru

МЕТОДЫ

УДК 57.089.67+57.086.2

БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА
ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

М.С. Котлярова^{1,*}, А.Ю. Архипова², А.М. Мойсенович¹, Д.А. Куликов³, А.В. Куликов⁴,
А.С. Коньков¹, М.А. Бобров³, И.И. Агапов⁵, М.М. Мойсенович², А.В. Молочков³,
А.В. Гончаренко², К.В. Шайтан¹

¹Кафедра биоинженерии и ²межкафедральная лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корп. 1;

⁴Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290, Московской обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3;

⁵Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова Минздрава России, Россия, 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1

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

Использование тканеинженерных конструкций на основе скаффолдов, имитирующих внеклеточный матрикс живой ткани, открывает новые возможности в лечении различных патологий и травм, связанных с повреждениями тканей и органов. Фиброин шёлка тутового шелкопряда *Bombyx mori* является биосовместимым, биорезорбируемым полимером, обладающим высокой механической прочностью и эластичностью, что позволяет создавать на его основе скаффолды для регенерации различных тканей, в том числе костной. В представленной работе были получены фиброиновые скаффолды в виде пористых губок, плёнок и гибридных скаффолдов, представляющих из себя бислойные конструкции, в которых трёхмерная структура, свойственная скаффолдам в виде губки, ограничена с одной стороны плёнкой. Были исследованы структура скаффолдов и их биосовместимость: показано, что иммортализованные и первичные фибробласты, а также остеобластоподобные клетки успешно прикрепляются к поверхности исследованных скаффолдов и пролиферируют на ней. В экспериментах *in vivo* на модели дефекта бедренной кости крысы через четыре недели после имплантации пористого фиброинового скаффолда в области имплантата наблюдались многочисленные очаги остеогенеза, что свидетельствует об остеокондукции скаффолдов.

Ключевые слова: регенерация, костные заменители, модель костного дефекта, фиброин, скаффолды, тканевая инженерия

Костная ткань характеризуется уникальной способностью при регенерации повреждений восстанавливать свою нативную структуру. Однако при наличии обширных повреждений, а также в пожилом возрасте и при некоторых патологических состояниях нормальная структура кости не может быть восстановлена. В таких случаях для активации процесса регенерации костной ткани используют костные имплантаты.

Способность к тканевой регенерации для костных имплантатов измеряется остеогенным, остеокондуктивным и остеоиндуктивным потенциалами [1]. Костные имплантаты должны обеспечивать структурную целостность кости, а также обладать способностью к остеокондукции, то есть способствовать восстановлению целостности кости за счет врастания ткани в материал [2]. Имплантаты, обладающие остеогенным потенциалом, содержат в себе остеобласты или их предшественники, восстанавливающие структуру кости [3]. При наличии у им-

плантата остеоиндуктивных свойств происходят миграция мезенхимальных стволовых клеток реципиента в зону повреждения и их дифференцировка в остеобласты, запускающие процесс регенерации [4].

Ауто- и аллотрансплантаты являются наиболее распространенным видом костных имплантатов, получаемых трансплантацией костной ткани в пределах одного организма или от донора. Аллотрансплантаты характеризуются остеокондуктивными и, в некоторых случаях, остеоиндуктивными свойствами, а аутоотрансплантаты также обладают остеогенным потенциалом [2]. Однако использование таких имплантатов ограничено рисками инфекционных осложнений и отторжения в случае аллотрансплантатов, а также недостаточностью материала при использовании аутоотрансплантатов [5]. В связи с этим активно развивается разработка костных заменителей.

Одним из вариантов решения этой задачи является использование тканеинженерных скаффолдов.

Скаффолды поддерживают целостность ткани или органа, а также обеспечивают субстрат для адгезии, миграции и пролиферации клеток, участвующих в процессе регенерации [6]. Материал скаффолдов должен быть биорезорбируемым, что позволяет скаффолду рассасываться в процессе формирования новой ткани. Для формирования таких конструкций может быть использован фиброин шёлка. Большие надежды возлагаются на использование фиброина в качестве основы для создания костных имплантатов, так как данный материал является одним из наиболее прочных природных полимеров и при этом обладает высокой биосовместимостью, устойчивостью и способностью к управляемой биорезорбции [7].

В настоящей работе исследованы свойства различных фиброиновых скаффолдов: плоских скаффолдов в виде пленки (СП), обладающих сложной трёхмерной структурой скаффолдов в виде пористой губки (СПГ) и бислойных гибридных скаффолдов (ГС), представляющих собой пористые конструкции, сформированные на пленке. В ходе исследования были изучены некоторые аспекты применения данных скаффолдов для регенерации костной ткани.

Материалы и методы

Формирование скаффолдов. СПГ и СП получали из водных растворов фиброина согласно методике, описанной ранее [8].

ГС получали посредством формирования пористого скаффолда на поверхности СП.

Для введения флуоресцентной метки скаффолды инкубировали в растворе тетраметилромадинизотиоцианата (ТРИТЦ, Sigma), не связавшийся краситель отмывали солевым фосфатным буфером.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Структуру скаффолдов изучали на микроскопе Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания). При подготовке к исследованиям проводили дегидратацию образцов в возрастающих концентрациях этилового спирта и ацетоне, затем высушивали на приборе Hitachi critical point dryer HCP-2 (Hitachi, Ltd., Япония) и напыляли слой платины толщиной 20 нм с использованием прибора Ion Coater IB3 (Eiko Engineering Co., Япония).

Клеточные линии и условия культивирования. Выделение мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ), экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP, green fluorescent protein), проводили, как описано ранее [9]. МЭФ и иммортализованные мышинные фибробласты линии 3Т3 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) производства ПанЭко (Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) производства NuClone (США). Остеобластоподобные клетки линии MG-63 культивировали на минимальной среде Игла (EMEM) производства Lonza (Бельгия), в которую добавляли 1% раствора заменимых аминокислот (NEAA) производства Lonza

(Бельгия) и 10% ЭТС. Все типы клеток культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂.

Культивирование клеток на скаффолдах. Все скаффолды стерилизовали в 70%-ном этаноле. Для проведения исследований *in vitro* отмывали скаффолды средами культивирования без добавления ЭТС. В лунки 24-луночных плашек помещали круглые фрагменты скаффолдов диаметром 15 мм и наносили на них клетки в 1 мл соответствующих сред культивирования. Через пять часов скаффолды переносили в чашки Петри диаметром 35 мм, содержащие по 2 мл среды. При культивировании клеток на скаффолдах каждые трое суток заменяли среды на свежие.

Фибробласты линии 3Т3 культивировали на СП и на пористой поверхности ГС. Исходная плотность клеток составляла 20 тыс. клеток на скаффолд. На первые, третьи и седьмые сутки проводили МТТ-тест, как описано ранее [10].

Для культивирования МЭФ были использованы СП, СПГ и ГС, меченные ТРИТЦ. На скаффолды наносили по 20 тыс. клеток. На первые, третьи и седьмые сутки культивирования клетки фиксировали и изучали образцы методом конфокальной микроскопии.

На меченные ТРИТЦ скаффолды всех типов наносили по 80 тыс. остеобластоподобных клеток MG-63 и культивировали их в течение суток. Затем фиксировали клетки 10%-ным формалином в солевом фосфатном буфере (БиоВитрум, Россия), окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (фаллоидин-Alexa FluorTM 488) производства Invitrogen (США), для выявления актинового цитоскелета и дигидрохлоридом 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Sigma-Aldrich, США) для обнаружения ядер клеток. Полученные препараты изучали методом конфокальной микроскопии.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Исследования проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония). Получали серии оптических срезов с использованием объективов CFI Plan Apo-chromat VC 20x/0,75 и Plan Fluor DIC 40x/1,30 Oil.

Модель искусственного дефекта бедренной кости. Изучение регенерации костной ткани *in vivo* проводили на крысах породы Wistar под наркозом (смесь анестетика ZoletilT 100 (Virbac, Франция) и миорелаксанта Рометар (Bioveta, Чехия) в стерильном фосфатно-солевом буфере в концентрациях 10% и 20% по объему, соответственно) в стерильных условиях. После выбривания операционного поля и обработки кожи 70%-ным раствором этанола создавали линейный разрез длиной до 25 мм. Фасции бедренной мышцы расслаивали вдоль до доступа к бедренной кости. Костный дефект в диафизе кости формировали с помощью стоматологического бора, диаметр дефекта составлял 2 мм. В полость имплантировали фрагмент пористого скаффолда соответствующего размера.

Приготовление гистологических образцов. Материал фиксировали в 10%-ном растворе Буэна (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты, формалин и уксусная кислота в соотношении 15:5:1). Дополнительно проводилась декальцинация в 25%-ном растворе трилона Б. Фрагменты костных тканей, прилегающих к области повреждения, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5–6 мкм. Затем срезы регидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином, а затем заливали в бальзам. Препараты изучали на микроскопе Axiovert 200M LSM510 META (CarlZeiss, Германия) с использованием камеры AxioCam MRC 5 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Получение различных типов скаффолдов из фиброина шёлка. Для изучения возможности создания биорезорбируемых костных заменителей на основе фиброина шелка были получены три типа скаффолдов: СП (рис. 1, А и Б), трёхмерные СПГ (рис. 1, В и Г) и бислойные ГС (рис. 1, Д и Е). С помощью СЭМ была охарактеризована структура поверхности полученных скаффолдов. Для СП был характерен микрорельеф (рис. 1, Б). Фиброиновые СПГ обладали трёхмерной пористой структурой со сложной топографией (рис. 1, Г). Особенностью ГС

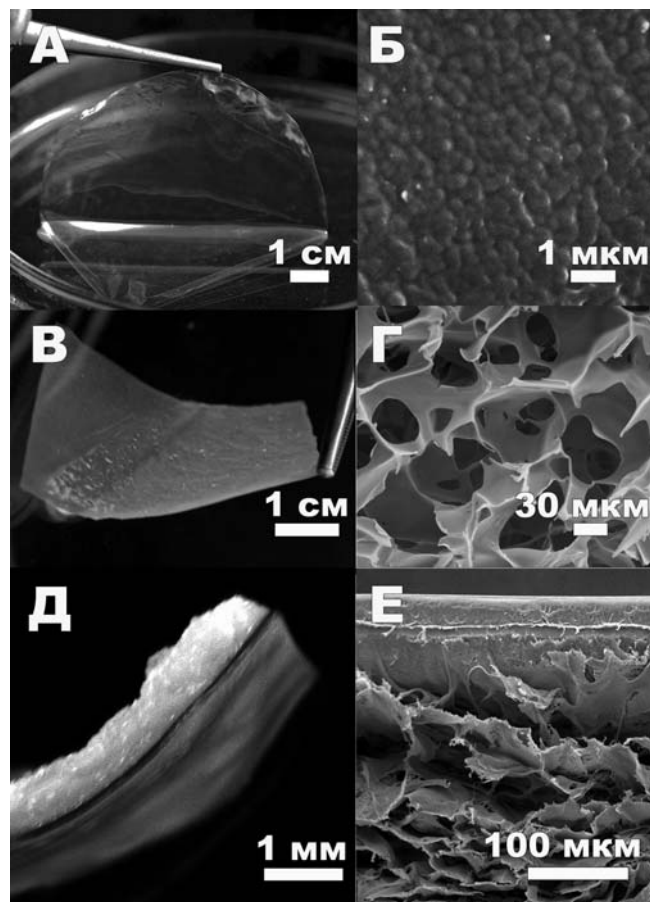


Рис. 1. Скаффолды на основе фиброина шёлка: СП (А–Б), СПГ (В–Г), ГС (Д–Е). Слева расположены макрофотографии конструкций, справа — структура поверхности скаффолдов (СЭМ)

(рис. 1, Д и Е) является формирование пористого скаффолда на фиброиновой пленке, что приводит к образованию бислойной гибридной конструкции, на одной стороне имеющей открытую, пористую структуру, а на другой — плоскую поверхность.

Культивирование фибробластов и остеобластоподобных клеток на различных типах скаффолдов на основе фиброина. Для изучения способности издел из фиброина шёлка поддерживать адгезию и пролиферацию клеток было проведено исследование адгезии и роста первичной культуры МЭФ, иммortalизованных фибробластов 3Т3 и клеток остеосаркомы человека MG-63 на разных типах фиброиновых скаффолдов. На рис. 2, А представлено изображение МЭФ на поверхности губчатой части гибридного скаффолда, поверхность которой показана на рис. 2, Б. Пролиферацию клеток на поверхности скаффолдов оценивали посредством МТТ-теста (рис. 2, В). Результаты экспериментов показали способность СП, СПГ и ГС поддерживать адгезию и пролиферацию клеток всех использованных в эксперименте типов. При этом фибробласты линии 3Т3 продолжали активно пролиферировать на пористой поверхности ГС до 7-х сут эксперимента, в то время как на СП прекращали рост после 3 сут культивирования.

При культивировании клеток остеосаркомы человека MG-63 на фиброиновых скаффолдах, имеющих трёхмерную структуру (СПГ и ГС), значительная часть клеток образовывала контакты с материалом скаффолда и другими клетками, лежащими в разных плоскостях (рис. 2, Д–Ж), что не было характерно для клеток, культивируемых на СП (данные не представлены).

Регенерация дефекта бедренной кости. Гистологический анализ области имплантации через 4 нед. после операции показал, что внутри скаффолда наблюдаются незначительная лимфоцитарная инфильтрация и очаги остеогенеза (рис. 3, А и Б). В области имплантата выявлялись остеогенные клетки — остеокласты, остеобласты и остециты.

Обсуждение

Создание различных типов биорезорбируемых скаффолдов для восстановления тканей является важной задачей для развития регенеративной медицины. В настоящей работе представлены три типа скаффолдов из фиброина (рис. 1), которые могут быть использованы для создания костных имплантатов на их основе.

Костные имплантаты, как правило, используются для заполнения объемных дефектов, что ограничивает применение плоских скаффолдов для этой цели. В основном они используются для модельных исследований и сравнения с трёхмерными конструкциями [11]. Тем не менее, СП также могут иметь свою область применения, в частности, для создания биорезорбируемых барьерных мембран, используемых при восстановлении периодонта. Их

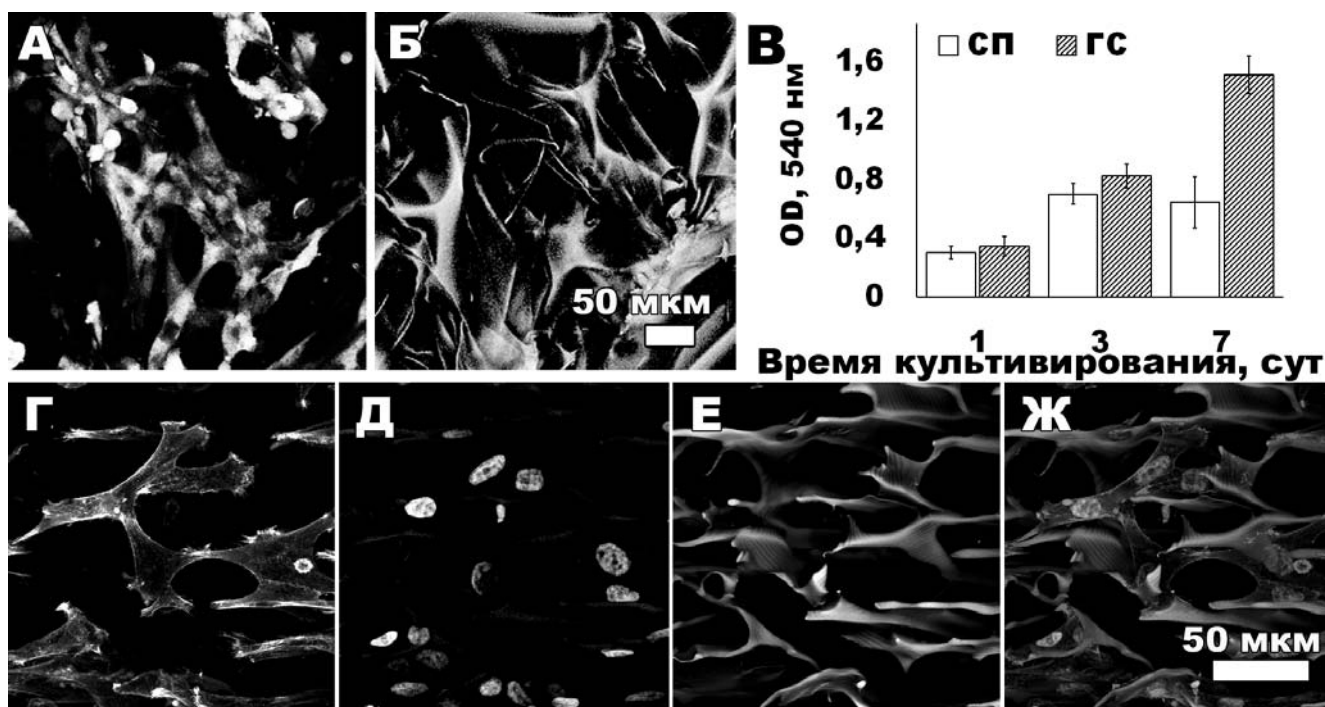


Рис. 2. Адгезия и пролиферация клеток на разных типах фиброиновых скаффолдов. Верхний ряд (А – В) – фибробласты на поверхности фиброиновых скаффолдов: А – МЭФ на поверхности ГС (выявлен GFP, накапливающийся в клетках, данные КЛСМ), Б – губчатая поверхность ГС, окрашенного ТРИТЦ (данные КЛСМ), В – пролиферация фибробластов линии 3Т3 на СП и ГС (данные МТТ-теста). Нижний ряд: (Г – Ж) – остеобластоподобные клетки MG-63 на поверхности СПГ, окрашенного ТРИТЦ (данные КЛСМ): Г – цитоскелет MG-63, выявленный фаллоидин – Alexa Fluor™ 488), Д – ядра клеток, визуализированные DAPI, Е – материал скаффолда, связанный с ТРИТЦ, Ж – наложение каналов Г–Е

функциональное значение состоит в том, чтобы физически отделить область дефекта от окружающих мягких тканей и не позволить быстро растущим эпителиальным клеткам заполнить ее раньше, чем в эту область вратут ткани периодонтальной связки и альвеолярных костей [12]. Также для этой цели могут быть использованы многослойные мембраны, имеющие с одной стороны гладкую поверхность – для обеспечения барьерной функции, а с другой пористую – для адгезии и пролиферации специфических клеток периодонта [13]. Таким образом, использование ГС, имеющих подобную структуру, для восстановления тканей периодонта представляется достаточно перспективным. Такого же типа гибридные конструкции были успешно использованы для восстановления дефекта свода черепа крысы [14].

Для восстановления дефектов кости наиболее часто применяются пористые скаффолды [15, 16]. Пористая структура скаффолда важна для миграции и пролиферации клеток, участвующих в регенерации кости, а также васкуляризации новообразованной ткани [17].

Изучение роста различных типов клеток на поверхности исследуемых скаффолдов показало биосовместимость материала и способность поддерживать адгезию и пролиферацию разных типов клеток на их поверхности (рис. 2).

Фибробласты – резидентные клетки соединительных тканей, оказывающие огромное влияние на процессы регенерации различных тканей и ор-

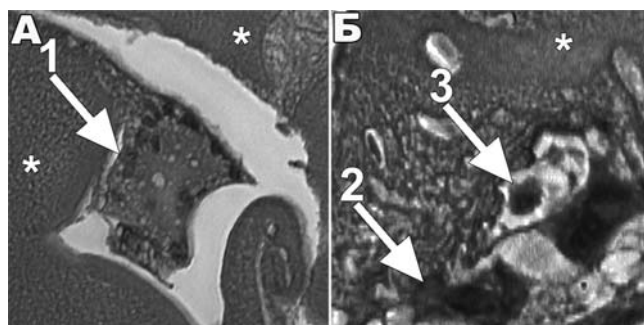


Рис. 3. Применение фиброиновых скаффолдов для регенерации костной ткани. А–Б – гистологический анализ тканей, сформированных на месте дефекта бедренной кости крысы, закрытого фиброиновым СПГ, окраска гематоксилин-эозином. А – остеокласт (1), взаимодействующий с материалом скаффолда (*), Б – остеобласты (2) и остециты (3) внутри материала скаффолда (*)

ганов [18]. Способность скаффолдов поддерживать адгезию и пролиферацию этого типа клеток является важным показателем биосовместимости.

При использовании СПГ и ГС клетки обнаруживались на поверхностях скаффолда, также значительная часть клеток образовывала контакты с материалом скаффолда и другими клетками в разных плоскостях (рис. 2, Д–Ж). Такие клетки, как фибробласты и остеобласты, *in vivo* находятся в трёхмерной среде, где они могут образовать контакты с внеклеточным матриксом и другими клетками во всех плоскостях [19]. Таким образом, при культивировании клеток на СПГ и ГС клетки находятся

в условиях, приближенных к физиологическим. Создание трёхмерной среды является одним из факторов, способствующих дифференцировке остеобластов [20, 21].

Имплантация пористого фиброинового скаффолда в область костного дефекта позволила в некоторой степени восстановить целостность кости, что способствовало сохранению ее функциональности в период регенерации. Через 4 нед. после операции в области имплантации были обнаружены клетки, участвующие в регенерации кости (рис. 3). Наблюдались остеобласты, вырабатывающие компоненты костного внеклеточного матрикса, в костных лакунах были выявлены остециты, обладающие характерной отростчатой формой. Также были обнаружены остеокласты, полинуклеарные макрофаги костной ткани, резорбирующие материал скаффолда.

Наличие остеоспецифических клеток, взаимодействующих с материалом скаффолда, указывает на его остеокондуктивные свойства, которые характеризуются способностью окружающей костной ткани врастать в имплантат [22].

Таким образом, разработанные фиброиновые скаффолды являются эффективным субстратом

для адгезии и пролиферации клеток, участвующих в регенерации тканей. СПГ и ГС являются наиболее оптимальными для создания костных заменителей, так как они обладают трёхмерной пористой структурой, необходимой для восстановления этого типа ткани. Было показано, что имплантация пористого скаффолда в область дефекта в бедренной кости приводит к появлению очагов остеогенеза внутри имплантата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 октября 2015 г. № 14.607.21.0119 “Создание набора прототипов изделий из биоискусственной костной ткани и модуляторов остеогенеза для регенеративной медицины”, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60715X0119.

Исследование выполнено с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета на оборудовании Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albrektsson T., Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration // *Eur. Spine J.* 2001. Vol. 10, suppl. 2. P. S96–S101.
2. Schroeder J.E., Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence // *Injury.* 2011. Vol. 42. N 6. P. 609–613.
3. Fillingham Y., Jacobs J. Bone grafts and their substitutes // *Bone Joint J.* 2016. Vol. 98, suppl. A. P. 6–9.
4. Miron R.J., Zhang Y.F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. // *J. Dent. Res.* 2012. Vol. 91. N 8. P. 736–744.
5. Laurencin C., Khan Y., El-Amin S.F. Bone graft substitutes // *Expert Rev. Med. Devices.* 2006. Vol. 3. N 1. P. 49–57.
6. Wu S., Liu X., Yeung K.W.K., Liu C., Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering // *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* 2014. Vol. 80. P. 1–36.
7. Melke J., Midha S., Ghosh S., Ito K., Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 31. P. 1–16.
8. Bagrov D., Zhuikov V., Chudinova Y., Yarisheva A., Kotlyarova M., Arkhipova A., Khaydapova D., Moisenovich M., Shaitan K. Mechanical properties of films and three-dimensional scaffolds made of fibroin and gelatin // *Biophys. J.* 2017. Vol. 62. N 1. P. 17–23.
9. Orlova A.A., Kotlyarova M.S., Lavrenov V.S., Volkova S.V., Arkhipova A.Y. Relationship between gelatin concentrations in silk fibroin-based composite scaffolds and adhesion and proliferation of mouse embryo fibroblasts // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. Vol. 158. N 1. P. 88–91.
10. Moisenovich M.M., Kulikov D.A., Arkhipova A.Y., Malyuchenko N.V., Kotlyarova M.S., Goncharenko A.V., Kulikov A.V., Mashkov A.E., Agapov I.I., Paleev F.N., Svistunov A.A., Kirpichnikov M.P. Fundamental bases for the use of silk fibroin-based bioresorbable microvehicles as an example of skin regeneration in therapeutic practice // *Ter. Arkh.* 2015. Vol. 87. N 12. P. 66–72.
11. Huang Y., Ren J., Ren T., Gu S., Tan Q., Zhang L., Lv K., Pan K., Jiang X. Bone marrow stromal cells cultured on poly (lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composites with chemical immobilization of ARG-GLY-ASP peptide and preliminary bone regeneration of mandibular defect thereof // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010. Vol. 95. N 4. P. 993–1003.
12. Sheikh Z., Hamdan N., Ikeda Y., Grynpsas M., Ganss B., Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review // *Biomater. Res.* 2017. Vol. 21, 9
13. Liao S., Wang W., Uo M., Ohkawa S., Akasaka T., Tamura K., Cui F., Watari F. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. N 36. P. 7564–7571.
14. Liao S., Yokoyama A., Zhu Y., Watari F., Ramakrishna S., Chan C.K. *In vitro* and *in vivo* behaviors of the three-layered nanocarbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite // *J. Bioact. Compat. Polym.* 2010. Vol. 25. N 2. P. 154–168.
15. Zhang W., Zhu C., Ye D., Xu L., Zhang X., Wu Q., Zhang X., Kaplan D.L., Jiang X. Porous silk scaffolds for delivery of growth factors and stem cells to enhance bone regeneration. // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. N 7. e102371.
16. Muraev A.A., Bonartsev A.P., Gazhva Yu.V. et. al. Development and preclinical studies of orthotopic bone implants based on a hybrid construction from poly (3-hydroxybutyrate) and sodium alginate // *Sovrem. Technol. Med.* 2016. Vol. 8. N 4. P. 42–49.
17. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold design for bone regeneration // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Vol. 14. N 1. P. 15–56.
18. Costa-Almeida R., Soares R., Granja P.L. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017. DOI: 10.1002/term.2405.
19. Akhmanova M., Osidak E., Domogatsky S., Rodin S., Domogatskaya A. Physical, spatial, and molecular aspects of

extracellular matrix of *in vivo* niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research // *Stem Cells Int.* 2015. Vol. 2015. Article ID 167025.

20. Tseng P.C., Young T.H., Wang T.M., Peng H.W., Hou S.M., Yen M.L. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3D microcarriers through alteration of cytoskeletal tension // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 2. P. 556–564.

21. Goncharenko A.V., Malyuchenko N.V., Moisenovich A.M., Kotlyarova M.S., Arkhipova A.Y., Kon'kov A.S., Agapov I.I., Molochkov A. V., Moisenovich M.M., Kirpichnikov M.P. Changes in morphology of actin filaments and expression of alkaline

phosphatase at 3D cultivation of MG-63 osteoblast-like cells on mineralized fibroin scaffolds // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. Vol. 470. N 1. P. 368–370.

22. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions // *J. Orthop. Surg. Res.* 2014. Vol. 9, 18.

Поступила в редакцию
07.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

METHODS

BIORESORBABLE SCAFFOLDS BASED ON FIBROIN FOR BONE TISSUE REGENERATION

M.S. Kotlyarova^{1,*}, A.Yu. Arkhipova², A.M. Moysenovich¹, D.A. Kulikov³, A.V. Kulikov⁴,
A.S. Kon'kov¹, M.A. Bobrov³, I.I. Agapov⁵, M.M. Moisenovich², A.V. Molochkov³,
A.V. Goncharenko², K.V. Shaitan¹

¹Department of Bioengineering and ²Laboratory of Confocal Microscopy, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

³M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
Shchepkina ul. 61/2–1, Moscow, 129110, Russia;

⁴Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Institutskaya
ul. 3, Pushino, 142290, Moscow region, Russia;

⁵Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,
Ministry of Health of the Russian Federation, Shchukinskaya ul. 1, Moscow, 113182, Russia

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

The use of tissue-engineering constructs based on scaffolds that imitate the extracellular matrix of living tissue unveils new opportunities in the treatment of various pathologies and injuries associated with tissue and organ damage. Silk fibroin of silkworm *Bombyx mori* is a biocompatible and bioresorbable polymer with high mechanical strength and elasticity. These features allow creating scaffolds on its basis for regeneration of various tissues, including bone tissue. In the present work fibroin scaffolds were obtained in form of porous sponges, films and hybrid scaffolds. The last ones are bilayer structures in which the porous sponges intrinsic three-dimensional structure is limited on the one side by the film. The structure of scaffolds and their biocompatibility was studied. The tests showed that immortalized and primary fibroblasts, as well as osteoblast-like cells, successfully adhere and proliferate on the surface of the studied scaffolds. Numerous osteogenesis foci were observed in the implant region in the *in vivo* experiments on the rat femoral bone defect model four weeks after the implantation of the fibroin porous scaffold. These results indicate the osteoconduction of the scaffolds.

Keywords: regeneration, bone substitutes, bone defect model, fibroin, scaffolds, tissue engineering

Сведения об авторах

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

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

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

Куликов Дмитрий Александрович — канд. мед. наук, уч. секретарь Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-681-93-90; e-mail: d.kulikov@monikiweb.ru

Куликов Александр Владимирович — докт. биол. наук, зав. лабораторией клеточно-тканевых механизмов компенсации функций биообъектов Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-91-94; e-mail: 29.04.55@mail.ru

Коньков Андрей Сергеевич — соискатель кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-59-65; e-mail: andrey.s.konkov@gmail.com

Бобров Максим Александрович — науч. сотр. патологоанатомического отделения Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-631-74-22; e-mail: m.a.bobrov@yandex.ru

Агапов Игорь Иванович — докт. бил. наук, зав. лабораторией бионанотехнологий Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова. Тел.: 8-499-190-66-19; e-mail: igor_agapov@mail.ru

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

Молочков Антон Владимирович — докт. мед. наук, проф. кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии, зам. директора по науке и международным связям Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-681-55-85; e-mail: a.molochkov@monikiweb.ru

Гончаренко Анна Владимировна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: pylaevanna@gmail.com

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

МЕТОДЫ

УДК 57.088.1

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ НУКЛЕОСОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ МЕТОДОМ ФЁРСТЕРОВСКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

О.В. Чертков^{1,2}, М.Е. Валиева¹, Н.В. Малюченко¹, А.В. Феофанов^{1,2,*}¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

На основе эффекта Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) разработана методика анализа структуры (Cy3, Cy5)-меченных нуклеосом в полиакриламидном геле после электрофореза в нативных условиях. Показано, что корректное применение этой методики требует контроля за неспецифическим межмолекулярным FRET и перепоглощением флуоресценции. Проведен сравнительный анализ результатов FRET-измерений двух типов нуклеосом и их комплексов с дрожжевым белком FACT, который подтвердил сходство структурных особенностей нуклеосом, выявляемых в геле и в водном растворе. Применение FRET-анализа в комбинации с электрофорезом позволяет не только разделить и визуализировать компоненты сложной смеси, оценив их относительное содержание, но и охарактеризовать структурные отличия этих компонентов *in situ*.

Ключевые слова: нуклеосома, флуоресценция, электрофорез, перенос энергии, микроскопия, эпигенетика

Первым уровнем структурной организации хроматина является нуклеосома, состоящая из участка ДНК длиной 147 пар нуклеотидов (п.н.), уложенного в виде 1,7 витка на поверхности октамера гистонов. Короткие фрагменты ДНК длиной 150–350 п.н., содержащие одиночные нуклеосомы, являются удобной экспериментальной системой для исследования многих сложных процессов, происходящих в ядре, таких как структурные перестройки нуклеосомы под действием белковых факторов [1], АТФ-зависимое ремоделирование хроматина [2], транскрипция [3], репликация [4] и репарация [5] ДНК. Исследования с использованием моонуклеосом проводятся с применением различных физико-химических подходов, начиная от высокотехнологичных, таких как рентгеноструктурный анализ [6], крио-электронная микроскопия [7], spFRET-микроскопия (микроскопия одиночных частиц на основе FRET – Фёрстеровского резонансного переноса энергии) [1, 8–13], и заканчивая более традиционными, но достаточно информативными методами гель-фильтрации [14], футпринтинга и электрофореза [15].

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях является простым и востребованным методом анализа белок-белковых и ДНК-белковых комплексов, позволяющим разделять их в зависимости от заряда и размера. Применительно к исследованию нуклеосом электрофорез используется для визуализации и разделения различных комплексов нуклеосом с белками, анализа про-

дуктов транскрипции и репликации *in vitro* [4], изучения условий образования субнуклеосомных (гексасомы, тетрасомы) и полинуклеосомных частиц. При этом в большинстве исследований окраска разделенных в геле компонентов используется для анализа их относительного количества и состава.

Введение в нуклеосому или анализируемый комплекс двух флуорофоров (донора и акцептора), между которыми реализуется FRET, дает возможность изучать структурные изменения в области расположения меток, что широко используется в исследованиях, проводимых в растворе, и в частности, в spFRET-микроскопии. Современная приборная база технически позволяет проводить измерения FRET и в геле, что способно значительно расширить информативность электрофоретического анализа. В то же время исследования нуклеосом с измерением FRET в геле проводились лишь в единичных случаях, с применением двух пар меток (Cy3B и ATTO647N [9], Alexa 488 и Alexa 594 [10]), и эти подходы требуют дальнейшей детальной разработки.

В настоящей работе описывается новая методика измерения FRET в геле для нуклеосом, меченных донор-акцепторной парой флуорофоров Cy3 и Cy5. На примере нуклеосом и их комплексов с дрожжевым белком yFACT (от англ. yeast и Facilitates Chromatin Transcription) показано, что структурные особенности, выявляемые на основе FRET-анализа в геле, согласуются с результатами исследований аналогичных образцов в водных растворах. Это подтверждает перспективность комбинирования

методик электрофореза с FRET-анализом для структурных исследований компонентов сложных реакционных смесей *in situ*.

Материалы и методы

В работе использовали: наборы для очистки фрагментов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и экстракции ДНК из геля фирмы Qiagen; ферменты рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и ДНК-полимеразу Taq фирмы New England Biolabs.

Флуоресцентно-меченные ДНК-матрицы с сильной нуклеосомпозиционирующей последовательностью s603 длиной 147 п.н. получали при помощи ПЦР с использованием следующих флуоресцентно-меченных праймеров:

M_Fw 5' – AGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTTGTGTTGTCTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCT*,

M_Rev 5' – ACCCCAGGGACTT*GAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGGTGGTTAGCCTTGA,

P_Fw 5' – CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCT*CCCTCCTTCCGTTGTGTTGTCTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTT,

P_Rev 5' – GATTGGT*GGCACGTAGCTACAATTCTCCGGGAGGCAAGGAATAATGAAGTTTCAGGGACCCCA,

где T* и T# – это, соответственно, Cy3- и Cy5-меченные нуклеотиды. Пары праймеров (P_Fw, P_Rev) и (M_Fw, M_Rev) использовали для получения ДНК-матриц с различным положением меток: соответственно, +13, +91 и +35, +113 п.н. от входа ДНК в нуклеосому.

Выделение и очистку ДНК-матриц, а также лигирование матрицы, меченной по положениям +13 и +91, с промоторным участком длиной 137 п.н. проводили, как описано ранее [11].

В качестве источника коровых гистонов для сборки нуклеосом на матрице, меченной по положениям +13 и +91 (далее нуклеосомы N(+13, +91)), использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [16]. Нуклеосомы N(+13, +91) собирали на ДНК-матрице в ходе диализа против NaCl в уменьшающихся концентрациях по протоколу, описанному ранее [16].

Нуклеосомы с метками в положениях +35 и +113 (далее нуклеосомы N(+35, +113)) собирали на октамере рекомбинантных гистонов лягушки *Xenopus laevis* в ходе диализа против NaCl в уменьшающихся концентрациях по протоколу, описанному ранее [17].

Комплексы N(+35, +113) с yFACT получали, как описано ранее [6] в буфере, содержащем 17 mM HEPES, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,8 mM Na₃EDTA, 0,11 mM 2-меркаптоэтанол, 11 mM NaCl, 1,1% глицерина и 12% сахарозы.

Электрофорез в нативных условиях проводили в 4%-ном ПААГ (акриламид:бисакриламид – 39:1) в буфере, содержащем 44,5 mM Трис-борат, 1 mM EDTA в течение 15–20 мин при 200 В. Нуклеосомы загружали в гель, добавив в раствор с ними 10% сахарозы. FRET-анализ полученного геля выполняли на приборе Typhoon Trio (GE Healthcare, США).

Для измерения сигнала FRET в геле исследуемые образцы подвергали электрофорезу в нативных условиях в 4%-ном ПААГ. После завершения электрофореза изображения распределения флуоресценции Cy3 и Cy5 в геле регистрировали в диапазонах 565–595 нм (сигнал Cy3) и 655–685 нм (сигнал Cy5) при возбуждении лазером с длиной волны 532 нм, контролируя отсутствие насыщения детектора (рисунок, Г и Е).

Интенсивность флуоресценции Cy3 и Cy5 в полосах интересующих компонентов определяли с помощью программы Gel analyzer (<http://www.gelanalyzer.com/index.html>), выбирая для оцифровки идентичные области на изображениях распределения сигналов Cy3 и Cy5. Интенсивности рассчитывали, вычисляя площади под соответствующими пиками с поправкой на базу.

Измеренные значения интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5 (соответственно, I₃ и I₅) использовали для расчёта эффективности FRET (E) с помощью уравнения:

$$E = (I_5 - 0,17I_3) / (I_5 + 0,83I_3) \quad (1),$$

где коэффициенты 0,17 и 0,83 введены для учета перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в диапазоне 655–685 нм.

Нуклеосомы N(+13, +91) выделяли из геля, как описано ранее [1]. spFRET-анализ нуклеосом N(+35, +113) и их комплексов с yFACT в растворе проводили по методике, описанной ранее [1, 11]. Результаты spFRET-измерений представляли в виде распределения нуклеосом по величине E и рассчитывали среднюю по выборке величину E (E_{ср}).

Результаты и обсуждение

Разработку методики измерения FRET в геле проводили с использованием нуклеосом, меченных донор-акцепторной парой флуорофоров Cy3 и Cy5 в двух разных участках нуклеосомы. В нуклеосомах N(+13, +91) метки, введенные в соседние суперспиральные витки ДНК, расположены вблизи входа ДНК в нуклеосому, а в N(+35, +113) – в срединной части нуклеосомы (рисунок, А). Как показано нами ранее, оба варианта мечения обеспечивают высокую эффективность FRET при измерениях методом spFRET-микроскопии в растворе и позволяют надежно выявлять изменения в укладке ДНК на гистоновом коре при воздействии различных факторов [11–13]. Помимо положения меток, N(+13, +91) и N(+35, +113) отличаются по происхождению коровых гистонов: для сборки N(+13, +91) использовали хроматин без гистона H1, выделенный

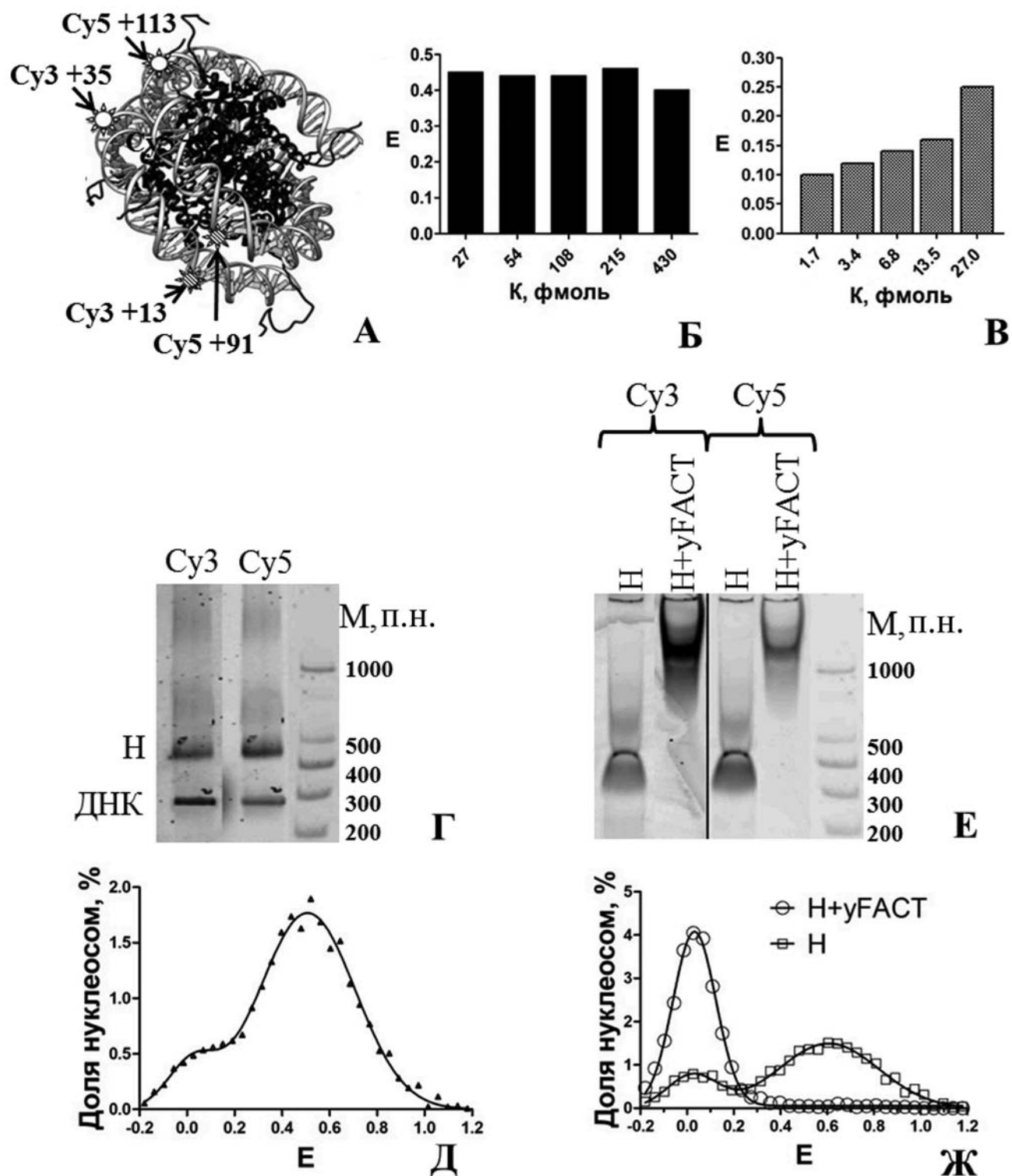


Рисунок. Анализ структуры нуклеосом в полиакриламидном геле методом FRET. А – Структура коровой части нуклеосомы и положения меток Cy3 и Cy5 в центральной части (+35 и +113) и вблизи входа ДНК в нуклеосому (+13 и +91). Октамер гистонов показан черным цветом. Б, В – Измеренные в геле величины E для нуклеосом (Б) и ДНК-матрицы (В), меченых по положениям +13 и +91, при разном количестве K образца, нанесенного на дорожку. Г, Е – Электрофореграммы нуклеосом N(+13,+91) (Г), N(+35,+113) и их комплексов с uFACT (Е). Дорожки Cy3 и Cy5 – распределения флуоресценции соответствующих меток при возбуждении 532 нм и регистрации сигнала соответственно в области 565–595 нм (Cy3) или 655–685 нм (Cy5). Н – нуклеосомы. М – маркеры ДНК с указанием их размеров в парах нуклеотидов (п.н.). Количество нанесенного образца – 54 фмоль на дорожку. Д, Ж – Измеренные методом spFRET-микроскопии в растворе распределения по величине E нуклеосом N(+13,+91), выделенных из геля (Д), а также N(+35,+113) и их комплексов с uFACT (Ж). Символами показаны экспериментальные данные. Сплошные линии – результаты аппроксимации экспериментальных данных суммой двух Гауссовых полос

из эритроцитов цыплят, а для N(+35, +113) — октамер рекомбинантных гистонов лягушки *X. laevis*.

Исследуемые образцы подвергали электрофорезу в нативных условиях в 4%-ном ПААГ, а измерение сигнала FRET в геле выполняли, как описано в разделе *Материалы и методы*. Чтобы исключить влияние на измеряемые интенсивности эффекта перепоглощения флуоресценции, с помощью флуоресцентно-меченных праймеров, несущих одну метку (Cy3 или Cy5), был определен диапазон (27–432 фмоль), в котором интенсивность флуоресценции в полосе на геле линейно зависела от количества нанесенного на дорожку образца (данные не приведены).

Обнаружено, что при возбуждении Cy3 часть флуоресценции этого хромофора проявляется и на изображении распределения флуоресценции Cy5. Это связано с частичным перекрыванием спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 655–685 нм и требует учета при расчете эффективности FRET (уравнение (1)). Прямого возбуждения флуоресценции Cy5 лазером с длиной волны 532 нм не обнаружено.

Концентрирование (Cy3, Cy5)-меченных молекул в геле в процессе электрофореза может в дополнение к внутримолекулярному FRET вызывать появление неспецифического межмолекулярного FRET, который обусловлен пространственной близостью меченых молекул. Для учета этого эффекта нами были измерены величины E при различных загрузках матрицы ДНК и нуклеосом, меченых по положениям +13 и +91 (рисунок, Б и В). Было установлено, что в случае нуклеосом величина E остается постоянной при разных количествах (K) загруженных в гель нуклеосом (27–430 фмоль на дорожку), что указывает на незначительный вклад межмолекулярного FRET в измеряемую величину. Однако в случае свободной ДНК в геле обнаружена явная зависимость величины E от K (рисунок, В). В то же время измерения в растворе показывают, что эффективность FRET для линейной формы свободной ДНК (+13, +91) равна нулю из-за большого расстояния между Cy3 и Cy5 [1]. Таким образом, наблюдаемый для ДНК в геле FRET обусловлен неспецифическими межмолекулярными взаимодействиями, и он проявляется даже при очень низкой загрузке ДНК (1,7 фмоль на дорожку). Основной причиной наблюдаемого межмолекулярного FRET, по-видимому, является очень сильное концентрирование ДНК в электрическом поле при движении в геле. На это указывает высокая локальная яркость сигнала флуоресценции ДНК и маленькая по сравнению с нуклеосомами толщина линий ДНК в геле (рисунок, Г и Е). Кроме того, известно, что при движении ДНК способна ориентироваться вдоль потока, что также может способствовать более плотной упаковке соседних молекул ДНК в геле и усилению межмолекулярного FRET.

Нуклеосомы N(+13, +91) в геле разделяются на две полосы: собственно нуклеосомы и свободную ДНК (рисунок, Г). Это связано с неполной сборкой нуклеосом на ДНК-матрице в исследованном образце. Измеренное значение эффективности FRET для полосы нуклеосомы в геле равнялось 0,47, что близко к величине $E_{\text{ср}} = 0,46$, рассчитанной для нуклеосом N(+13, +91), выделенных из геля и исследованных в растворе методом spFRET-микроскопии (рисунок, Д). В полосе ДНК значение эффективности FRET равно 0,14, что, как обсуждалось выше, определяется неспецифическим межмолекулярным FRET, характерным для свободной ДНК в геле.

Чтобы подтвердить соответствие величин эффективности FRET (а, следовательно, и структурных особенностей), измеренных для нуклеосом в геле, значениям эффективности FRET в растворе, нами был проведен FRET-анализ в геле нуклеосом N(+35, +113) и их комплексов с уFACT. уFACT является хроматин-ремоделирующим белковым комплексом и шапероном гистонов. Ранее для нуклеосом, собранных с использованием хроматина из эритроцитов цыплят, нами было обнаружено, что уFACT способен обратимо и АТФ-независимо раскручивать нуклеосомную ДНК без потери гистонов [1]. Проведенные нами измерения методом spFRET-микроскопии в растворе показали, что аналогичный эффект уFACT реализуется и в случае N(+35, +113), собранных на рекомбинантных гистонах лягушки (рисунок, Ж). На это в распределении комплексов N(+35, +113) с уFACT по эффективности FRET указывают: исчезновение состояния с большими значениями E , характерными для плотноупакованных нуклеосом; появление доминирующего состояния с низкими значениями E , характерными для раскрученной нуклеосомной ДНК (рисунок, Ж). Сходные изменения в эффективности FRET наблюдаются для комплексов N(+35, +113) с уFACT и в геле (рисунок, Е). Так, в геле для N(+35, +113) и их комплексов с уFACT были получены значения E , которые соответственно равны 0,46 и 0,13. Эти значения хорошо согласуются с величинами $E_{\text{ср}}$ 0,49 и 0,08, определенными для N(+35, +113) и их комплексов с уFACT методом spFRET-микроскопии в растворе.

Проведенные исследования показывают, что в процессе электрофореза в нативных условиях у нуклеосом и их комплексов с белками сохраняются структурные особенности, характерные для водных растворов, а методика измерения FRET в геле позволяет выявить их. При этом в геле происходит разделение компонентов, состояний и комплексов нуклеосом, имеющих различную электрофоретическую подвижность, что дает возможность визуализировать их, оценить относительное содержание, а с помощью FRET-анализа — еще и изучить структурные отличия. FRET-анализ в геле имеет широкий спектр приложений, выходящий

далеко за границы исследований нуклеосом и их комплексов. Однако, как показывает пример свободной ДНК, разработка и применение FRET-анализа в геле требует контроля за неспецифическим

межмолекулярным FRET и перепоглощением флуоресценции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Dechassa M.L., Sabri A., Pondugula S., Kassabov S.R., Chatterjee N., Kladde M.P., Bartholomew B. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 38. N 4. P. 590–602.
3. Kulaeva O.I., Hsieh F.K., Studitsky V.M. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. N 25. P. 11325–11330.
4. Chang H.W., Pandey M., Kulaeva O.I., Patel S.S., Studitsky V.M. Overcoming a nucleosomal barrier to replication // *Sci. Adv.* 2016. Vol. 2. N 11. e1601865.
5. 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.
6. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
7. 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. 5787–5795.
8. 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.
9. Buning R., Kropff W., Martens K., van Noort J. spFRET reveals changes in nucleosome breathing by neighboring nucleosomes // *J. Phys. Condens. Matter.* 2015. Vol. 27. N 6. 064103.
10. Gansen A., Tóth K., Schwarz N., Langowski J. Opposing roles of H3- and H4-acetylation in the regulation of nucleosome structure—a FRET study // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 3. P. 1433–1443.
11. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.
12. Sultanov D., Gerasimova N., Kudryashova K., Maluchenko N., Kotova E., Langelier M.-F., Pascal J., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genetics.* 2017. Vol. 4. N 1. P. 21–31.
13. Valieva M.E., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Kozlova A.L., Kirpichnikov M.P., Hu Q., Botuyan M.V., Mer G., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Stabilization of nucleosomes by histone tails and by FACT revealed by spFRET microscopy // *Cancers (Basel).* 2017. Vol. 9. N 1, 3. DOI:10.3390/cancers9010003.
14. Shimahara H., Hirano T., Ohya K., Matsuta S., Seeram S.S., Tate S. Nucleosome structural changes induced by binding of non-histone chromosomal proteins HMGN1 and HMGN2 // *FEBS Open Bio.* 2013. Vol. 3. P. 184–191.
15. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
16. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.
17. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2AH2B displacement // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 35. N 3. P. 365–376.

Поступила в редакцию
24.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

METHODS

ANALYSIS OF NUCLEOSOME STRUCTURE IN POLYACRYLAMIDE GEL USING FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER METHOD

O.V. Chertkov^{1,2}, M.E. Valieva², N.V. Malyuchenko², A.V. Feofanov^{1,2,*}

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

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

On the basis of Förster resonance energy transfer (FRET) effect a method to analyze the structure of (Cy3, Cy5)-labeled nucleosomes in polyacrylamide gel after electrophoresis in native conditions was developed. It is shown that the correct application of the method requires monitoring of nonspecific intermolecular FRET and fluorescence re-absorption. A comparative

analysis of the results of the FRET measurements of two types of nucleosomes and their complexes with yeast protein FACT was performed, which confirmed the similarity of the structural features of nucleosomes detected in the gel and in aqueous solution. An application of FRET analysis in combination with electrophoresis allows one to separate and visualize components of a complex mixture, evaluate their relative content, and, in addition, to characterize the structural differences between these complexes *in situ*.

Keywords: *nucleosome, fluorescence, electrophoresis, energy transfer, microscopy, epigenetics*

Сведения об авторах

Чертков Олег Валерьевич — вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: o_chertkov@mail.ru

Валиева Мария Евгеньевна — аспирантка биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: durnopreyko-maria@gmail.ru

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05, e-mail: mal_nat@mail.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.2:579.695

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ФЕНОЛА И 2,4-ДИХЛОРФЕНОЛА, *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* 17S, ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОКОВ**В.В. Коробов*, Е.Ю. Журенко, Н.В. Жарикова, Т.Р. Ясаков, Т.В. Маркушева**

Уфимский Институт биологии РАН, Россия, 450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69

*e-mail: vacikk@mail.ru

Описан новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола (2,4-ДХФ), *Rhodococcus erythropolis* 17S, выделенный из почвы химического предприятия, имеющего длительную историю контакта с фенолом и его производными. Идентификация штамма проведена с учетом морфометрических, культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК. Исследован рост периодической культуры *R. erythropolis* 17S в условиях использования фенола и 2,4-ДХФ в качестве источников углерода и энергии. Содержание фенола в культуральной жидкости снижалось к 4-м сут на 55%, а 2,4-ДХФ — к 22-м сут на 47% от контроля. Выявлена возможность применения *R. erythropolis* 17S для утилизации фенола в промышленных стоках нефтехимического производства и производства дубильных экстрактов.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis*, штамм-деструктор, фенол, 2,4-дихлорфенол, удаление отходов, сточные воды

Фенол и его хлорированные производные являются загрязнителями промышленных стоков химических и нефтеперерабатывающих заводов, обогатительных фабрик цветной металлургии, производств переработки древесины, сланцев, торфа, бурого и каменного угля. К настоящему моменту выявлен ряд микроорганизмов, способных использовать в качестве источников углерода и энергии фенол и 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ), в том числе: *Achromobacter* sp. [1], *Agromyces* sp. IBRB-34DCP [2], *Pseudomonas* sp. EST1001 [3, 4], *Pseudomonas* sp. JS150 [5] и *Rhodococcus erythropolis* [6].

В ряде работ было отмечено, что бактерии рода *Rhodococcus* обладают широким метаболическим потенциалом и способны к росту в присутствии различных органических субстратов в концентрациях, не всегда потребляемых другими микробами [7, 8]. Вместе с тем деструкция фенола и его хлорпроизводных представителями рода *Rhodococcus* отмечена лишь в единичных публикациях.

Целью настоящей работы было выявление свойств нового штамма *Rhodococcus erythropolis* 17S — деструктора фенола и 2,4-ДХФ.

Материалы и методы

Штамм *R. erythropolis* 17S был выделен из пробы почвы расположенного в г. Уфа (Республика Башкортостан) предприятия, производившего и использовавшего фенол и его хлорпроизводные в производственных циклах более полувека.

Выделение и идентификация штамма по признакам морфологической, морфометрической, физи-

ологической и биохимической дифференциации. Выделение чистой культуры *R. erythropolis* 17S было проведено на селективной среде следующего состава: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,6 г/л; KH_2PO_4 — 2,4 г/л; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 5,6 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0 г/л; раствор микроэлементов — 0,1 мл/л; вода дистиллированная с добавлением 100 мг/л фенола или 2,4-ДХФ в качестве единственного источника углерода и энергии. Культуральные и физиолого-биохимические свойства изолята определяли согласно методическому руководству под ред. А.И. Нетрусова [9]. Морфометрические и морфологические характеристики были получены с помощью атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Россия) [10]. Сканирование объектов вели в контактном режиме по методу постоянной силы с использованием кантилеверов CSG01 с радиусом кривизны зонда 10 нм. Изображения были получены с помощью двухпроходной методики съемки.

Рост культуры в жидкой питательной среде и его контроль. Посевной материал получали выращиванием бактерий в разведенном в 8 раз мясопептонном бульоне при температуре 30°C. Далее культуру засевали в количестве 1 мл в жидкую среду следующего состава (г/л): NH_4Cl — 1; K_2HPO_4 — 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; ZnSO_4 — 0,008; фенол (2,4-ДХФ) — 0,1, после чего инкубировали в термостатируемых орбитальных встряхивателях УВМТ-12-250 (Элион, СССР) при 115–120 об/мин. Контроль роста вели с использованием фотокolorиметра

КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

Определение количества фенола осуществляли стандартным фотометрическим методом [11]. Для анализов отбирали по 5 мл культуральной жидкости, которую освобождали от клеток центрифугированием (3630 g, 30 мин). Далее к пробе последовательно приливали 30 мкл 2%-ного раствора 4-аминоантипирина, 100 мкл 2%-ного раствора аммиака и 100 мкл 2%-ного раствора железосинеродистого калия. Смесь перемешивали после добавления каждого компонента реакции и через 10 мин измеряли коэффициент пропускания на фотокolorиметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Количество фенола определяли по градуировочному графику, построенному в стандартных условиях определения.

При определении количества фенола в сточных водах использовали методическое руководство по анализу сточных вод нефтеперерабатывающих и нефтехимических заводов [12]. Сразу после отбора пробы сточных вод консервировали 50%-ным едким натром из расчета 5 мл NaOH на 1 л пробы, а затем их помещали в перегонную колбу, добавляли 10%-ный раствор CuSO_4 , подкисляли разбавленной серной кислотой и далее отгоняли фенол. В дальнейшем ход определения меняли в зависимости от концентрации фенола в полученном отгоне. При концентрации фенола больше 0,4 мг/л определение проводили так же, как в культуральной жидкости, а при содержании меньше 0,4 мг/л фенол извлекали экстрагирующей смесью хлороформ-изоамиловый спирт. Содержание фенола находили по калибровочной кривой, которую строили по значениям стандартных образцов.

Секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК, сравнение последовательностей и филогенетический анализ. Для получения амплификатов и последующего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК использовалась универсальная праймерная система: 8f – (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), 926r – (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT), 1492r – (GGT TAC CCT TGT TAC GAC TT). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл – 3 мин при 95°C; последующие 35 циклов – 0,5 мин при 95°C, 0,5 мин при 57°C, 1,5 мин при 72°C; завершающий цикл – 5 мин при 72°C. Сравнительный анализ амплификатов осуществляли путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 5 В/см [13].

Секвенирование ДНК проводилось в трех повторях на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, США). Для поиска последовательностей с высоким уровнем идентичности генов 16S рРНК использовалась база данных GenBank [14]. Филогенетическое древо было построено в программе MEGA7 [15] с использованием метода Neighbor-Joining [16]. Эволюционные

расстояния рассчитывались с помощью метода максимального составного правдоподобия (Maximum Composite Likelihood) [17]. Достоверность ветвления определялась с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (значимыми признавались величины больше 50) [18].

Результаты и обсуждение

Идентификация штамма *R. erythropolis* 17S.

На момент анализа микробная популяция *R. erythropolis* 17S была представлена неспорообразующими клетками в виде искривленных коротких палочек (60% от всего числа клеток) и овалами (25%), а также небольшим числом средних и длинных палочек, расположенных одиночно, в парах и в скоплениях неправильной формы. Размеры всех этих форм варьировали в пределах от 0,4–0,8 до 0,6–3,2 мкм.

Наблюдалась положительная окраска клеток по Граму, при этом клетки могли легко обесцвечиваться.

Культура *R. erythropolis* 17S при росте на мясопептонном агаре образовывала колонии бело-кремового цвета. Оптимальный рост культуры наблюдался в аэробных условиях в пределах от +22°C до +37°C при значениях pH 7–8. Штамм метаболизировал D-лактозу, D-мальтозу, использовал минеральный азот, глицин и тиамин, при разложении глюкозы образовывал небольшое количество кислоты. Клетки обладали каталазной и казеиназной активностью, осуществляли гидролиз желатины.

Секвенирование и сравнительный анализ вариабельных участков гена 16S рРНК длиной 539 п.н. позволил выявить 29 близких типовых штаммов родов *Rhodococcus* и *Nocardia*. При этом исследуемый изолят образовывал кластер с типовыми штаммами N11 (X79289) и ATCC 4277 (X81929) вида *R. erythropolis*. Уровень идентичности между исследуемыми последовательностями составил 99,6% и 98,3%, соответственно. Принимая во внимание то, что, согласно критериям молекулярной систематики, уровень идентичности между штаммами должен составлять не менее 97%, изучаемый штамм был отнесен к *R. erythropolis* (рис. 1). Последовательность гена 16S рРНК *R. erythropolis* 17S была депонирована в международной базе данных GenBank под номером KY563744.

На основании выявленных морфометрических, физиолого-биохимических, культурально-морфологических признаков, а также сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК штамм 17S был идентифицирован как *Rhodococcus erythropolis* 17S.

Субстратная специфичность штамма *Rhodococcus erythropolis*. В ходе дальнейшей работы был исследован рост периодической культуры *R. erythropolis* 17S на феноле и 2,4-ДХФ.

Существенное накопление массы клеток при использовании фенола в качестве источника углерода и энергии начиналось с первых суток культивирования (рис. 2). Экспоненциальная фаза роста

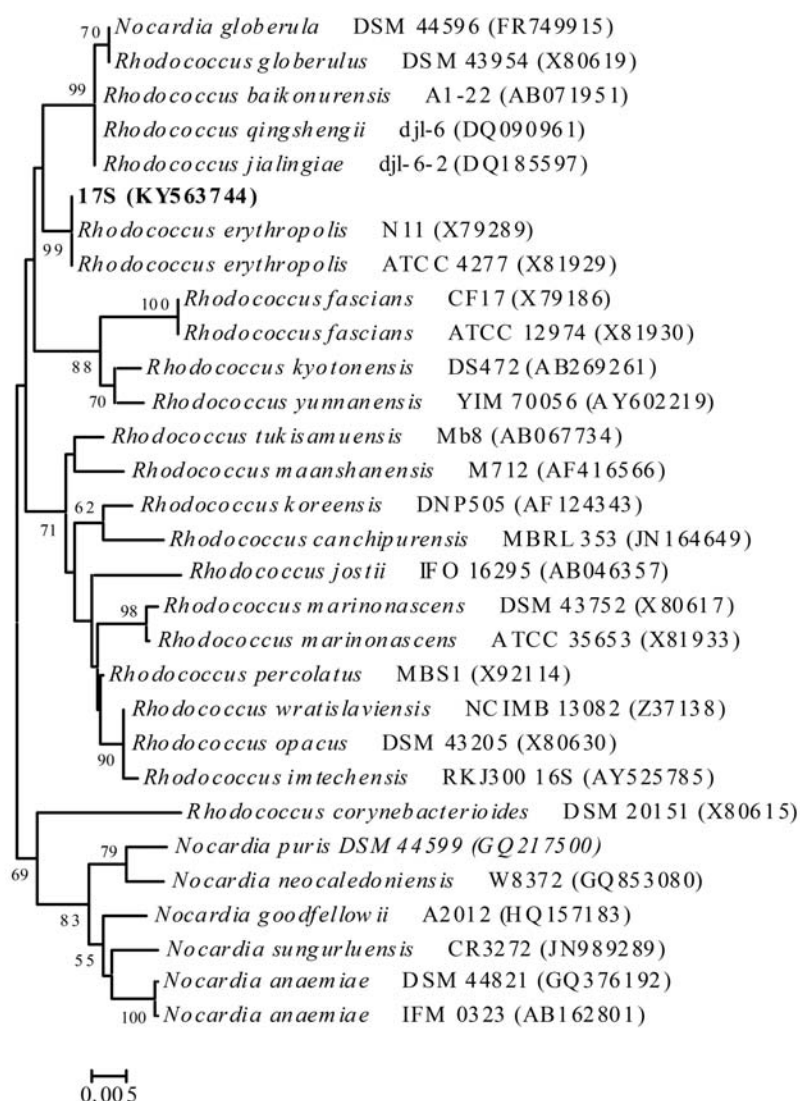


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное методом Neighbor-Joining на основании сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК штамма 17S и близких ему последовательностей типовых штаммов бактерий. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью “bootstrap”-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера GenBank

длилась около двух суток, и оптическая плотность (OP_{590}) достигала 0,7 оптических единиц (о.е.), а затем, достигая плохо выраженной стационарной фазы, культура заканчивала свой рост. Содержание фенола в культуральной жидкости снижалось в течение двух суток на 30%, а к четвертым суткам — на 55% от начального уровня.

Анализ динамики показателей роста штамма *R. erythropolis* 17S при использовании 2,4-ДХФ в качестве субстрата позволил констатировать, что биомасса накапливалась достаточно медленно и только к 14-м сут инкубации показатель OP_{590} достигал 0,12 о.е. При этом концентрация 2,4-ДХФ постепенно снижалась и составляла к 22-м сут 53% от начальной.

Приведенные выше результаты показывают, что *R. erythropolis* 17S способен использовать фе-

нол и 2,4-ДХФ в качестве единственного источника углерода и энергии. Сравнивая графики, можно отметить, что утилизация молекул хлорированного фенола являлась более сложной задачей для *R. erythropolis* 17S, чем конверсия молекул фенола. Это наблюдение согласуется с ранее полученными данными о том, что атомы хлора делают ароматический субстрат менее доступным для микроорганизмов. В ряде работ была исследована скорость утилизации фенола и 2,4-ДХФ. Так, при культивировании *Agromyces* sp. IBRB-34DCP на феноле и 2,4-ДХФ при начальной концентрации 100 мг/л содержание фенола снижалось к 3-м сут на 44%, а к 9-м — на 74% от исходного значения. Количество 2,4-ДХФ уменьшалось к 3-м сут на 45%, к 9-м — на 73% [2]. При концентрации 2,4-ДХФ 50 мг/л адаптированная культура *R. erythropolis* через 7 сут полностью

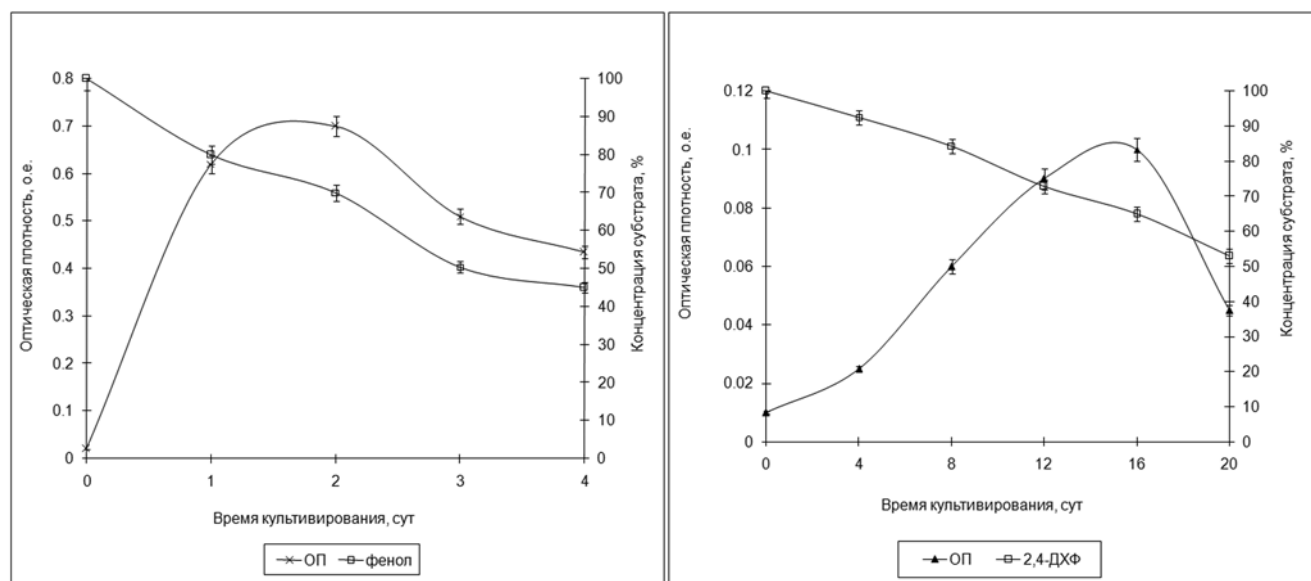


Рис. 2. Графики зависимости значений оптической плотности клеточной суспензии ОП₅₉₀, а также концентрации фенола и 2,4-ДХФ, используемых в качестве единственного источника углерода и энергии, от времени инкубации штамма *R. erythropolis* 17S в периодической культуре

утилизировала данный субстрат [6]. Ранее было проведено исследование биodeградации 2,4-ДХФ в биореакторе культурой *Achromobacter* sp. Результаты показали, что 2,4-ДХФ в концентрации 25 мг/л был полностью утилизирован в течение 5 ч [1]. Как известно, рост концентрации ксенобиотиков оказывает подавляющее влияние на рост бактерий. В связи с этим, способность *R. erythropolis* 17S расти при более высоких концентрациях фенола и 2,4-ДХФ является его конкурентным преимуществом, и может быть использована для очистки сточных вод с более высоким содержанием этих соединений.

Использование штамма *R. erythropolis* 17S для доочистки от фенола сточных вод предприятий нефтехимического профиля. Известно, что очистку и обезвреживание сточных вод предприятий нефтехимического профиля от фенола проводят обычно в две ступени: на первой происходит освобождение стоков от механических примесей в отстойниках, ловушках и фильтрах различных систем. Далее используются физико-химические методы: экстракция органическими растворителями, адсорбция, очистка с применением фильтров, парорециркуляция. Как показывает практика, после такой обработки в стоках могут присутствовать остаточные количества фенола, удаление которых затруднено типичными для доочистки стоков плохой аэрацией и низким содержанием питательных веществ. С учетом того, что родококки отличаются способностью длительно оставаться жизнеспособными в олиготрофных условиях за счет азотфиксации, запасаения и эффективного использования эндогенных фосфорных соединений, проведено исследование возможности доочистки загрязненных фенолом сточных вод двух промышленных предприятий,

занимающихся нефтехимическим производством (НХП) и производством дубильных экстрактов (ПДЭ) культурой *R. erythropolis* 17S.

Содержание фенола в пробах сточных вод предприятия НХП составляло 0,09 мг/л, а в стоках компании ПДЭ – 0,74 мг/л. После 3 сут воздействия бактерий концентрация фенола снижалась до 0,012 и 0,155 мг/л, соответственно (рис. 3). Полученные данные показывают, что культура *R. erythropolis* 17S проявила активность в реальных условиях загрязненных сточных вод обоих производств. Существенное изменение содержания фенола в сточных водах при использовании *R. erythropolis* 17S наблюдалось уже после первых суток воздействия. Степень очистки сточных вод, достигаемая при использовании штамма *R. erythropolis* 17S, составляла для стоков НХП 86,7%, а для стоков ПДЭ – 79,1%.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в настоящее время представители рода *Rhodococcus*, выгодно отличающиеся длительным сохранением жизнеспособности в неблагоприятных условиях, психрофильностью и термотолерантностью, могут рассматриваться в качестве перспективных объектов биотехнологии. В практическом плане для целевой конверсии ксенобиотиков особый интерес представляют адаптированные штаммы родококков из экотопов, подвергавшихся техногенному воздействию. Результаты данной работы свидетельствуют о возможности использования выделенного из техносферы штамма *R. erythropolis* 17S для направленной деградации фенола. Полученные данные дополняют понимание процессов взаимодействия микроорганизмов с чужеродными соединениями.

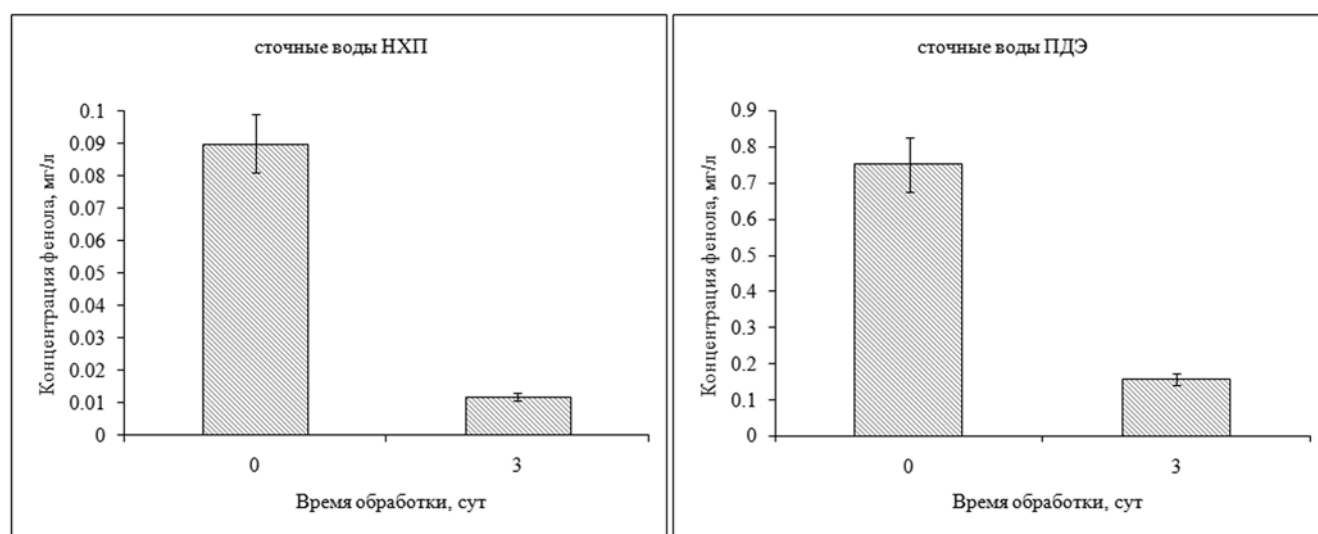


Рис. 3. Диаграмма остаточного содержания фенола на третьи сутки обработки сточных вод НХП и ПДЭ культурой *R. erythropolis* 17S

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Quan X., Shia H., Zhange Y., Wang J., Qiana Y. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. // Sep. Purif. Technol. 2004. Vol. 34. N 1–3. P. 97–103.
2. Коробов В.В., Жарикова Н.В., Анисимова Л.Г., Ясков Т.Р., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Маркушева Т.В. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2013. Т. 15. № 3–4. С. 1320–1322.
3. Kivisaar M.A., Habicht J.K., Heinari A.L. Degradation of phenol and *m*-toluate in *Pseudomonas* sp. strain EST1001 and its *Pseudomonas putida* transconjugants is determined by a multiplasmid system // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. N 9. P. 5111–5116.
4. Nurk A., Kasak L., Kivisaar M. Sequence of the gene (*phe A*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* // Gene. 1991. Vol. 102. N 1. P. 13–18.
5. Haigler B.E., Pettigrew C.A., Spain J.C. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150 // Appl. Envir. Microbiol. 1992. Vol. 58. N 7. P. 2237–2244.
6. Горлатов С.Н., Мальцева О.В., Шевченко В.И., Головлева Л.А. Разложение хлорфенолов культурой *Rhodococcus erythropolis* // Микробиология. 1989. Т. 58. № 5. С. 802–806.
7. Korshunova I.O., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Pistsova O.N. The effect of organic solvents on the viability and morphofunctional properties of rhodococcus // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. Vol. 52. N 1. P. 43–50.
8. Serebrennikova M.K., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Ivshina I.B. Adaptation of coimmobilized *Rhodococcus* cells to oil hydrocarbons in a column bioreactor // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. Vol. 50. N 3. P. 265–272.
9. Практикум по микробиологии. Уч. пособие для вузов / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
10. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy // Biotechnol. Prog. 2004. Vol. 20. N 6. P. 1615–1622.
11. Коробов В.В., Маркушева Т.В., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Штамм бактерий *Serratia marcescens* В-6493 – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Биотехнология. 2006. № 2. С. 63–65.
12. Методическое руководство по анализу сточных вод нефтеперерабатывающих и нефтехимических заводов. М. 1977. С. 367–387.
13. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Markusheva T.V., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Kuznetsov B.B. Isolation and sequence analysis of pCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA // Saudi J. Biol. Sci. 2016. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014.3
14. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33, suppl. 1. P. D34–D38.
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. Vol. 33. N 7. P. 1870–1874.
16. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. N 4. P. 406–425.
17. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101. N 30. P. 11030–11035.
18. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. N 4. P. 783–791.

Поступила в редакцию
07.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

MICROBIOLOGY

THE POSSIBILITY OF USING PHENOL- AND 2,4-DICHLOROPHENOL-DEGRADING STRAIN, *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* 17S, FOR CLEANING OF INDUSTRIAL WASTEWATER

V.V. Korobov*, E.I. Zhurenko, N.V. Zharikova, T.R. Iasakov, T.V. Markusheva

Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, prospect Oktyabrya 69, Ufa, 450054, Russia

*e-mail: vacikk@mail.ru

Isolation and characterization of a new phenol- and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP)-degrading bacterium from the soil contaminated with phenol and its derivatives for a long time are reported. The strain 17S was identified as *Rhodococcus erythropolis* based on the results of 16S rRNA sequence analysis data and its phenotypic, physiological and biochemical features. The growth of *R. erythropolis* 17S in batch culture using phenol and 2,4-DCP as sources of carbon and energy has been studied. The concentration of phenol and 2,4-DCP in culture medium decreased by 55% (at the 4th day) and 47% (at the 22nd day) from the control values, respectively. It is concluded that *R. erythropolis* 17S can be used for phenol utilization in industrial wastewaters of petrochemical and tanning extracts manufacturing.

Keywords: *Rhodococcus erythropolis*, degrader strain, phenol, 2,4-dichlorophenol, waste disposal, wastewater

Сведения об авторах

Коробов Владислав Викторович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: vacikk@mail.ru

Журенко Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: zhurenkoe@gmail.ru

Жарикова Наталья Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: puzzle111@yandex.ru

Ясаков Тимур Рамилевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: iasakov@anrb.ru

Маркушева Татьяна Вячеславовна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: tvmark@anrb.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.3:577.152.34

СЕКРЕЦИЯ МИКРОМИЦЕТАМИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ, АКТИВНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИБРИЛЛЯРНЫМ БЕЛКАМ

Е.А. Попова¹, Д.М. Бедненко¹, А.А. Осмоловский^{1,*},
В.Г. Крейер¹, И.Б. Котова¹, Н.С. Егоров²¹Кафедра микробиологии и ²Международный биотехнологический центр, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Показано, что микромицеты *Aspergillus ustus* 1 и *Tolypocladium inflatum* k1 секретируют протеолитические ферменты, обладающие высокой коллагенолитической, фибринолитической и эластолитической активностью. Активность протеиназ, гидролизующих фибриллярные белки, определяемая по расщеплению азоколлагена, у *T. inflatum* k1 составила $122,6 \cdot 10^{-3} \text{ E}_{\text{АзК}}/\text{мл}$ у *A. ustus* 1 и $69,7 \cdot 10^{-3} \text{ E}_{\text{АзК}}/\text{мл}$ ($\text{E}_{\text{АзК}}$ — количество расщепившегося за 1 мин азоколлагена в микрограммах). Максимальные значения активности наблюдались при культивировании в глубинных условиях *A. ustus* 1 в течение 4 сут, а *T. inflatum* k1 — в течение 5 сут. Показано, что максимумы проявления коллагенолитической и общей протеолитической активности при культивировании у *A. ustus* 1, в отличие от *T. inflatum* k1, разнесены во времени, что, предположительно, может упростить процедуру получения активных по отношению к фибриллярным белкам протеиназ.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, протеолитическая активность, фибринолитические ферменты, коллагенолитические ферменты, эластолитические ферменты, энзиматический индекс

Протеолитические ферменты, высокоактивные по отношению к фибриллярным белкам, находят свое применение в различных промышленных отраслях. Например, для размягчения мясного сырья в пищевой промышленности и шкур животных в легкой промышленности используют коллагенолитические протеиназы [1]. Протеиназы, обладающие фибринолитической активностью, входят в состав препаратов, необходимых для комплексной тромболитической терапии, что делает их важным продуктом медицинской промышленности [2, 3].

Существующие способы получения подобных ферментов обладают некоторыми недостатками. Так, технология получения брахиуринов из гепатопанкреаса камчатских крабов отличается образованием большого количества отходов во время производственного процесса, требующих утилизации [4]. Среди бактериальных продуцентов коллагенолитических ферментов наиболее активным является *Clostridium histolyticum* — анаэробная спорообразующая патогенная бактерия, возбудитель газовой гангрены [5]. Использование такого продуцента требует повышенных мер безопасности на всех стадиях производства. В последнее время все большее внимание в качестве источников коллагенолитических и фибринолитических ферментов уделяется микромицетам. Среди продуцентов таких протеиназ известны представители родов *Alternaria*,

Aspergillus, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium* [1–3]. Однако образуемые некоторыми видами этих микромицетов ферменты не всегда по своим свойствам оказываются перспективными для применения. Поэтому изучение коллагенолитических и фибринолитических ферментов, продуцируемых микромицетами, и поиск среди них наиболее подходящих по-прежнему остаются актуальными.

Протеолитическая активность у обнаруженных в последнее время штаммов микромицетов *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1 и *Purpureocillium lilacinum* k1 может представлять значительный интерес [3]. Известно, что для микромицетов—энтомопатогенов, таких как *B. bassiana* 2 и *T. inflatum* k1, характерен широкий спектр образуемых внеклеточных протеолитических ферментов, что обусловлено их паразитическим образом жизни, а именно необходимостью преодоления жестких покровов насекомых при прорастании спор [6, 7]. Для микромицетов—сапротрофов *A. ustus* 1 и *P. lilacinum* k1 показаны высокие значения фибринолитической активности, что позволяет предположить образование и других, высокоактивных по отношению к фибриллярным белкам, ферментов [3].

Целью работы было изучение протеолитической активности *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1 и *Purpureocillium lilacinum* k1 по отношению к фибриллярным белкам.

Материалы и методы

Объекты исследования и их культивирование. В работе были изучены микромицеты из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, отобранные ранее в качестве продуцентов протеолитических ферментов: *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1, *Purpureocillium lilacinum* k1 [3].

Выявление протеолитического потенциала штаммов проводили при поверхностном культивировании в чашках Петри на средах следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,25, пептон – 5,0, казеинат натрия, желатин, фибрин, эластин – 10,0, агар – 15,0 [8]. Посев производили уколом в центр чашки, измерения диаметров зон гидролиза и колоний проводили через 7 сут. Энзиматический индекс (EI) рассчитывали по следующей формуле – $EI = \frac{EI}{(D+d)}$, где D – диаметр колонии в мм, а d – диаметр зоны гидролиза в мм [8–10].

Культивирование микромицетов в глубинных условиях проводили в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об/мин) при 28°C. Выращенные на скошенном сусло-агаре 7-суточные культуры использовали в качестве посевного материала. Процесс культивирования осуществляли в две стадии: первые двое суток – в посевной среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [8], затем часть биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (г/л): глицерин – 70,0, глюкоза – 30,0, соевая мука – 5,0, пептон – 5,0, NaH_2PO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,5, KCl – 0,5.

Определение протеолитической активности. Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона-Хагихары по количеству тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах протеолиза после 10-минутного гидролиза 1%-ного раствора казеина в 0,1 М Трис-НCl буфере (рН 8,0–8,2, 37°C), как описано ранее [11]. Активность выражали в мкМ тирозина в минуту ($E_{\text{Тир}}$).

Коллагенолитическую активность определяли колориметрически с использованием азоколлагена по общепринятой методике. Активность выражали как количество расщепившегося за 1 мин азоколлагена в микрограммах ($E_{\text{Азк}}$) [3, 12].

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Hitachi, Япония).

Опыты проводили в трех повторностях. Приведенные результаты представляют собой средние значения, ошибка которых не превышала 5–7%. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Поверхностное культивирование *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1 и *Purpureocillium lilacinum* k1 на чашках Петри с белковыми субстратами – казеинатом натрия, желатином, фибрином и эластином – позволило провести оценку действия секретируемых протеиназ на глобулярные и фибриллярные белки. Гидролиз казеината натрия в составе среды показывает общий протеолитический потенциал микромицетов, а фибриллярных белков – специфичность секретируемых ими протеиназ. Величину протеолитического потенциала использованных штаммов рассчитывали по величине EI на средах с казеином ($E_{\text{Каз}}$), желатином ($E_{\text{Жел}}$), фибрином ($E_{\text{Фиб}}$) и эластином ($E_{\text{Эл}}$).

В таблице представлены EI для каждого штамма микромицетов, а также отношения их величин друг к другу.

Как видно из таблицы, наибольшее значение EI было показано для микромицета *A. ustus* 1 на среде с желатином и составило 1,96. Проявление зон гидролиза данного субстрата соответствует коллагенолитической активности образуемого *A. ustus* 1 комплекса протеиназ, выявленной ранее [11]. Од-

Таблица

Энзиматические индексы микромицетов при росте на средах с различными белковыми субстратами

Микромицет	На среде с казеином ($E_{\text{Каз}}$)	На среде с желатином ($E_{\text{Жел}}$)	На среде с фибрином ($E_{\text{Фиб}}$)	На среде с эластином ($E_{\text{Эл}}$)	$E_{\text{Каз}} / E_{\text{Жел}}$	$E_{\text{Каз}} / E_{\text{Фиб}}$	$E_{\text{Каз}} / E_{\text{Эл}}$
<i>Tolypocladium inflatum</i> k1	1,75	1,64	1,25	1,56	1,07	1,40	1,13
<i>Beauveria bassiana</i> 2	1,73	1,60	1,17	1,67	1,08	1,48	1,04
<i>Aspergillus ustus</i> 1	1,63	1,96	1,16	1,13	0,83	1,41	1,44
<i>Purpureocillium lilacinum</i> k1	1,10	1,29	1,09	1,11	0,85	1,01	0,99

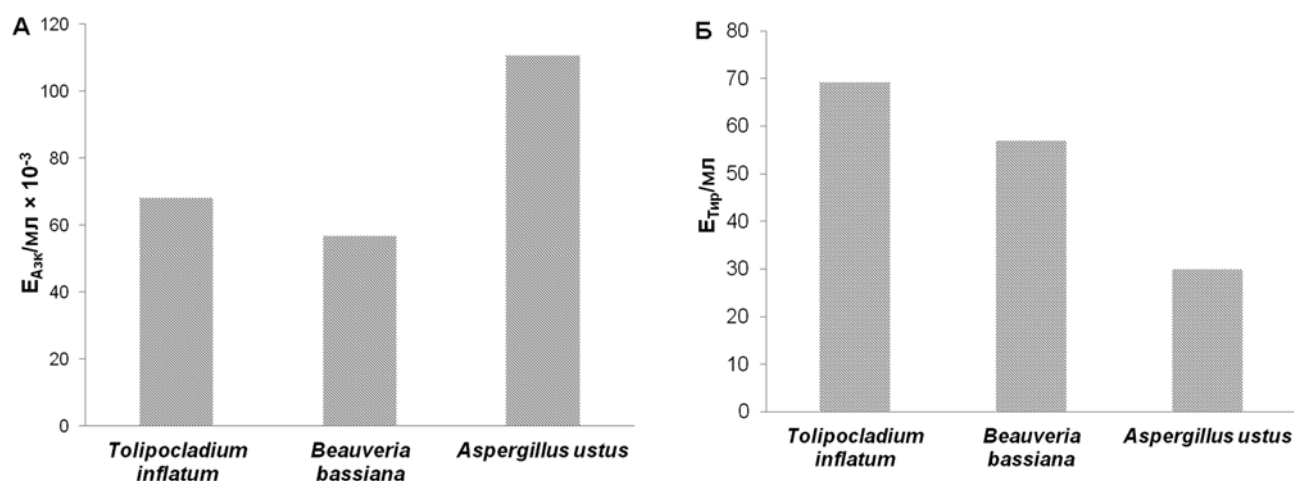


Рис. 1. Общая протеолитическая (А) и коллагенолитическая (Б) активность микромицетов *Beauveria bassiana* 2, *Tolipocladium inflatum* k1 и *Aspergillus ustus* 1

нако в случае с другими фибриллярными белками протеиназы, секретируемые *A. ustus* 1, не проявляют столь высокой активности. Значения ЕІ при росте микромицетов на средах с фибрином и эластином составили 1,16 и 1,13, соответственно. Для оценки эффективности действия протеиназ продуцентов на фибриллярные белки важным является соотношение целевой (специфической) и неспецифической активности [11, 13, 14], которую можно представить в виде соотношений ЕІ, полученных при росте микромицетов на среде с казеинатом натрия и на средах с каждым из изученных фибриллярных белков. Для *A. ustus* 1 значение $E_{\text{каз}}/E_{\text{жел}}$ оказалось небольшим (0,83). Это указывает на высокий уровень секреции ферментов, расщепляющих преимущественно фибриллярные, а не глобулярные белки.

Значения ЕІ для микромицетов *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2 оказались достаточно близкими и составили 1,75 и 1,73 для среды с казеинатом натрия, 1,64 и 1,60 для среды с желатином, 1,25 и 1,17 для среды с фибрином, 1,56 и 1,67 для среды с эластином, соответственно. Помимо достаточно высоких значений ЕІ, полученных на среде с желатином, микромицеты *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2 проявляют протеолитическую активность и по отношению к эластину. Значения, полученные для *P. lilacinum* k1, были достаточно низкими, что позволило исключить данный штамм из дальнейшей работы.

Для количественного определения активности протеиназ микромицетов по отношению к фибриллярным белкам в качестве общепринятого субстрата реакции использовали азоколлаген [1, 15], по отношению к глобулярным — казеин [16]. Были изучены коллагенолитическая и общая протеолитическая активность ферментов, образуемых *A. ustus* 1, *B. bassiana* 2 и *T. inflatum* k1 на 5-е сут культивирования в глубинных условиях. Как следует из данных, представленных на рис. 1, А и Б, наиболее высокое

значение коллагенолитической активности показано для *A. ustus* 1 ($110,6 \cdot 10^{-3} E_{A3K}/\text{мл}$). Оно превышало соответствующее значение активности *T. inflatum* k1 в 1,7 раз, а *B. bassiana* 2 — почти в 2 раза. Общая протеолитическая активность была выше у протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1 ($69,2 E_{\text{Тип}}/\text{мл}$), что оказалось на 18% больше активности *B. bassiana* 2 и более чем в 2 раза превысило значение активности протеиназ *A. ustus* 1.

Учитывая высокие значения активности протеиназ, образуемых данными штаммами, по отношению к фибриллярным белкам, мы изучили динамику накопления протеолитических ферментов микромицетами *A. ustus* 1 и *T. inflatum* k1 (рис. 2, А и Б). Было показано, что коллагенолитическая активность протеиназ, секретируемых *A. ustus* 1, достигает максимума на 4-е сут культивирования и составляет $122,6 \cdot 10^{-3} E_{A3K}/\text{мл}$; максимальное значение общей протеолитической активности приходилось на 5-е сут и составило $30,5 E_{\text{Тип}}/\text{мл}$ (рис. 2, А). Стоит отметить, что максимальное проявление как общей протеолитической, так и коллагенолитической активности у *A. ustus* 1 наблюдалось только в одной точке, в отличие от активности протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1. Для данного микромицета было характерно проявление двух пиков общей протеолитической активности, соответствующих 3-м ($70,3 E_{\text{Тип}}/\text{мл}$) и 5-м ($64,4 E_{\text{Тип}}/\text{мл}$) сут, и одного максимума коллагенолитической активности — на 5-е сут, $69,710^{-3} E_{A3K}/\text{мл}$ (рис 2, Б).

Результаты изучения динамики накопления протеолитических ферментов микромицетами *A. ustus* 1 и *T. inflatum* k1 демонстрируют ряд технологических преимуществ штамма *A. ustus* 1. Так, активность протеиназ *A. ustus* 1, гидролизующих фибриллярные белки, в 1,7 раз выше, чем у *T. inflatum* k1, а максимум накопления изученных протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в среде наблюдается на сутки раньше,

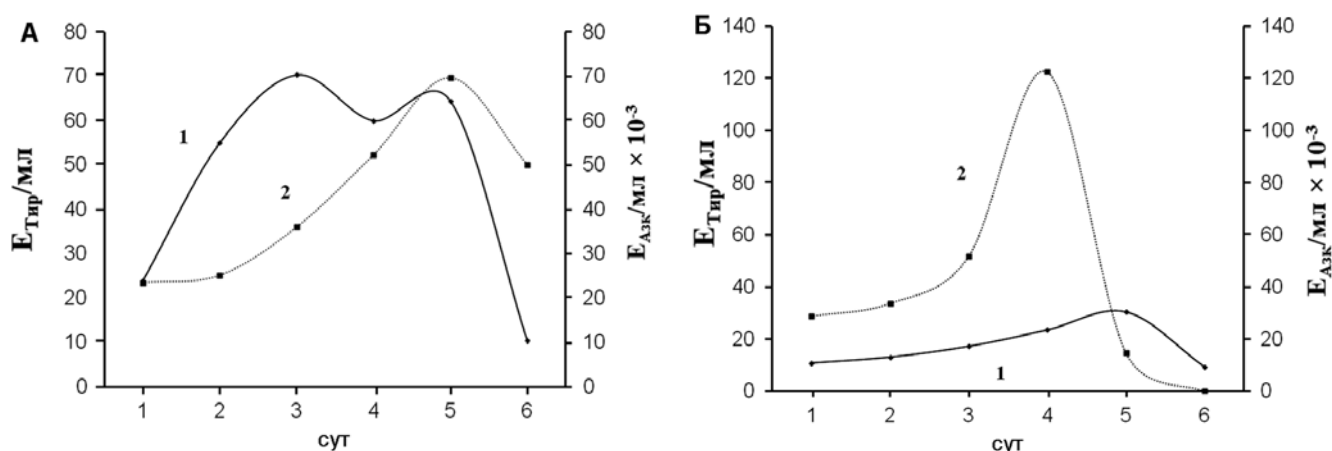


Рис. 2. Динамика накопления протеолитических ферментов микромицетами *Aspergillus ustus* 1 (А) и *Tolypocladium inflatum* k1 (Б). 1 — общая протеолитическая активность, 2 — коллагенолитическая активность

чем у *T. inflatum* k1. Кроме того, максимумы проявления коллагенолитической и общей протеолитической активности при культивировании у *A. ustus* 1 разнесены во времени, в отличие от *T. inflatum* k1, что, предположительно, может упростить процедуру получения активных в отношении фибриллярных белков протеиназ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wanderley M.C. de A., Neto J.M.W.D., Filho J.L. de L., Lima C. de A., Teixeira J.A.C., Porto A.L.F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review // Braz. J. Microbiol. 2017. Vol. 48. N 1. P. 13–24.
2. 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.
3. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
4. Rudenskaya G.N. Brachyurins, serine collagenolytic enzymes from crabs // Russ. J. Bioorg. Chem. 2003. Vol. 29. N 2. P. 101–111.
5. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. Vol. 63. N 5. P. 520–526.
6. Hasan S., Ahmad A., Purwar A., Khan N., Kundan R., Gupta G. Enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* // Bioinformation. 2013. Vol. 9. N 5. P. 238–242.
7. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects // Mycopathologia. 2011. Vol. 171. N 5. P. 299–323.
8. 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.
9. Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // Int. J. Microbiol. 2012. Vol. 22. Article ID 578925.
10. Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi N.H. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from angrrove soil of Mahanadi river delta and their cellulose pro-

duction ability // Am. J. Microbiol. Res. 2014. Vol. 2. N 1. P. 41–46.
- 11. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
- 12. Chavira R. Jr., Burnett T.J., Hageman J.N. Assaying proteinase with Azocoll // Anal. Biochem. 1984. Vol. 136. N 2. P. 446–450.
- 13. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.
- 14. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreyer 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.
- 15. Lima C.A., Viana Marques D.A., Neto B.B., Lima Filho J.L., Carneiro-da-Cunha M.G., Porto A.L.F. Fermentation medium for collagenase production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 // Biotechnol. Prog. 2011. Vol. 27. N 5. P. 1470–1477.
- 16. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. Гидролитическая система нокардиоформной бактерии *Nocardia minima* в процессе ее роста, развития и дифференциации // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.

Поступила в редакцию
27.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

MICROBIOLOGY

SECRETION OF EXTRACELLULAR PROTEINASES, ACTIVE AGAINST FIBRILLARY PROTEINS, BY MICROMYCETES

*E.A. Popova*¹, *D.M. Bednenko*¹, *A.A. Osmolovskiy*^{1,*}, *V.G. Kreyer*¹, *I.B. Kotova*¹, *N.S. Egorov*²

¹Department of Microbiology and ²International Biotechnology Center,
School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: aosmol@mail.ru

Micromycetes *Aspergillus ustus* 1 and *Tolypocladium inflatum* k1 were shown to produce proteolytic enzymes with high collagenolytic, fibrinolytic and elastolytic activity. The activity of the proteinases against fibrillar proteins was determined by the cleavage of azocollagen: collagenolytic activity was $122.6 \cdot 10^{-3} E_{Azc}/ml$ (E_{Azc} – the amount of azocollagen cleaved in 1 min in micrograms) for proteinases produced by *A. ustus* 1 and $69.7 \cdot 10^{-3} E_{Azc}/ml$ for proteinases produced by *T. inflatum* k1. The maximum activity values were observed at submerged cultivation of *A. ustus* 1 during 4 days, and *T. inflatum* k1 during 5 days. It has been shown that the maximum of collagenolytic and general proteolytic activity during the cultivation of *A. ustus* 1 are time-separated, unlike *T. inflatum* k1. This fact, presumably, can simplify the procedure for obtaining of active proteinases.

Keywords: *proteinases of micromycetes, proteolytic activity, fibrinolytic enzymes collagenolytic enzymes, elastolytic enzymes, enzymatic index*

Сведения об авторах

Попова Елизавета Андреевна – науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: veliana@gmail.com

Бедненко Дарья Михайловна – магистрант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: bi17bi03da@mail.ru

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

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

Котова Ирина Борисовна – докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-72; e-mail: kira1959@gmail.com

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.063.8:579.84

**РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ ПОЛИКЕТИДСИНТАЗ
В ГЕНОМАХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭПИЛИТИЧЕСКИХ БИОПЛЕНОК ОЗЕРА БАЙКАЛ****Е.В. Суханова*, Е.А. Зименс, В.В. Парфенова, О.И. Белых***Лимнологический институт СО РАН, Россия, 664033, г. Иркутск, Улан-Баторская, д. 3***e-mail: sukhanova17@gmail.com*

Многие вторичные метаболиты бактерий, включая перспективные в фармакологическом отношении, синтезируются с помощью ферментных комплексов поликетидсинтаз (PKS). В работе определены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и PKS у штаммов гетеротрофных бактерий, выделенных из эпилитических биопленок, сформированных в литоральной зоне озера Байкал. По результатам молекулярно-филогенетического анализа генов 16S рРНК установлена следующая таксономическая принадлежность изолированных штаммов: *Serratia fonticola* 1A и 10A, *Pseudomonas umsongensis* K10-2 и K10-3, *Rheinheimera tilapia* K18 и *Flavobacterium* sp. 43-09. У исследуемых штаммов определены 33 последовательности фрагментов генов, кодирующих PKS. Среди гомологичных нуклеотидных последовательностей обнаружены гены, ответственные за биосинтез антибиотиков (диффицидина, эритромицина, курацина, миксаламида, кораллопиронина, миксатиазола) и цитостатиков (ромидепсина, спирохостатина, дисоразола). Невысокое сходство (50–83%) аминокислотных последовательностей PKS байкальских бактерий с опубликованными в GenBank последовательностями свидетельствует об их потенциальной способности продуцировать новые, до настоящего времени неизвестные, биоактивные соединения. Полученные результаты показывают, что исследуемые штаммы могут представлять практический интерес для биотехнологии.

Ключевые слова: гены поликетидсинтаз, 16S рРНК, гетеротрофные микроорганизмы, озеро Байкал, клонирование, эпилитические биопленки

Озеро Байкал – крупнейший и самый глубокий пресный водоем на Земле – характеризуется значительным биоразнообразием и высокой степенью эндемизма гидробионтов, уникальными экологическими особенностями и богатством биотопов, являясь своего рода природной лабораторией для изучения метаболического потенциала микробных сообществ. Известно, что микроорганизмы продуцируют огромное количество биологически активных веществ (БАВ), многие из которых используются в биологии и медицине. Показано, что микробные сообщества, населяющие разнообразные, большей частью уникальные и экстремальные, места обитания, служат важнейшим ресурсом новых и редких метаболитов [1–3]. В последнее время особое внимание при поиске новых БАВ уделяют микробным сообществам биопленок, так как известно, что 95–99% микроорганизмов в природных условиях существуют в виде специфически организованных, прикрепленных к субстратам микробных ассоциаций [4]. Биопленки, сформированные на камнях (эпилитические) – это, как правило, морфологически и физиологически гетерогенные структуры, отличающиеся богатым видовым составом и высокой численностью бактерий, которые проявляют многообразие метаболических путей и формируют сложную систему кооператив-

ного и конкурентного взаимодействия [5]. Очевидно, что поиск продуцентов различных БАВ в микробных сообществах биопленок является перспективным.

К настоящему времени показано, что широкий ряд вторичных метаболитов бактериального происхождения синтезируется мультидоменными ферментными мегасинтазами: поликетидсинтазами (PKS), синтазами нерибосомных пептидов (NRPS) и их гибридными комплексами PKS/NRPS [6].

Поликетиды характеризуются разнообразной химической структурой и функциональной активностью, среди них антибиотики, статины, ингибиторы роста опухолей и многие другие фармацевтически значимые соединения. Известно три типа PKS (I, II и III), различающиеся в зависимости от структуры и механизма катализа. PKS типа I организованы в модули, состоящие как минимум из трех доменов: кетоацилсинтазы (KS), ацилтрансферазы (AT) и ацил-переносящего белка (ACP). Каждый модуль отвечает за один цикл элонгации поликетидной цепи [6]. Для детекции и идентификации в геноме бактерий генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов поликетидной природы, успешно используют праймеры, специфичные к консервативным участкам KS-домена PKS [1, 3, 7]. Например, подобный подход был применен для

изучения микроорганизмов, ассоциированных с гидробионтами озера Байкал [9, 10]. Авторы показали, что в метагеномном сообществе байкальских эндемичных губок *Lubomirskia baicalensis* и *Swartschewskia raryuracea* присутствуют последовательности генов, кодирующих биосинтез курацина А, стигмателлина и ностофицина [8, 9]. В геномах 9 из 14 культур родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, выделенных из *L. baicalensis*, выявлены гены PKS и NRPS [10].

Цель данной работы — оценка разнообразия генов поликетидсинтаз в геномах гетеротрофных бактерий, выделенных из эпилитических биопленок озера Байкал.

Материалы и методы

Изучены шесть штаммов гетеротрофных бактерий из коллекции лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН, выделенных из эпилитических биопленок. Пробы биопленок отобраны в прибрежной зоне озера Байкал около пос. Листвянка и в проливе Малое Море в 2012 г. Штаммы предварительно идентифицированы по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам и на основе определения последовательностей генов 16S рРНК как представители родов *Rheinheimera*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Proteobacteria) и *Flavobacterium* (Bacteroidetes).

Выравнивание последовательностей генов 16S рРНК (длина 1429 п.н.) и построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью пакета программ Mega 6.06, применяя метод максимального правдоподобия (двухпараметрическая модель Кимуры). Бутстреп-поддержка была рассчитана на 1000 реплик.

Для поиска и идентификации генов PKS ДНК выделяли из 100 мкл суточной культуральной суспензии по протоколам производителя с помощью набора “ДНК-сорб В” (“Роспотребнадзор”, Россия). Амплификацию фрагментов KS-доменов генов PKS проводили, используя вырожденные праймеры DK-F (5'-GTGCCGGTNCCTGNGYYTC-3') и DK-R (5'-GCGATGGAYCCNCARCARYG-3') в режиме, описанном ранее [8]. Ампликоны визуализировали в 1%-ном агарозном геле с помощью трансиллюминатора (VL-6.МС, Франция). ПЦР-фрагменты клонировали в векторе pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentes, Литва), после чего проводили трансформацию компетентных клеток штамма *E. coli* DH-5α.

Нуклеотидные последовательности определяли на генетическом анализаторе 3500xL (Applied Biosystems, США). Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ BLASTX и BLASTP.

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов PKS (33 шт.) депонированы в GenBank под номерами: LT220194–LT220203, LT555230–LT555239, LT555293–LT555305.

Результаты и обсуждение

Филогенетический анализ генов 16S рРНК. BLAST-анализ последовательностей нуклеотидов 16S рДНК *Serratia* spp. 1А и 10А из озера Байкал показал 99,8% сходства с типовыми штаммами *Serratia fonticola* DSM 4576 и *Serratia glossinae* DSM 22080T. Последовательности генов 16S рРНК байкальских изолятов и данных штаммов формировали на древе совместный кластер (рисунок). Бактерия *S. glossinae* выделена в 2010 г. из кишечника мухи цеце (*Glossina palpalis gambiensis*), которая известна как переносчик трипаносом — возбудителей сонной болезни в африканских странах [11], *S. fonticola* изолирована из питьевой воды в 1979 г. [12]. Позднее по результатам физиолого-биохимических тестов и гибридизации ДНК установили, что *S. fonticola* и *S. glossinae* не имеют существенных отличий и поэтому являются синонимичными видами [13]. Таким образом, принимая во внимание полученные нами результаты и литературные данные, байкальские штаммы *Serratia* spp. 1А и 10А мы определили как вид *S. fonticola*.

BLAST-анализ последовательностей гена 16S рРНК штаммов *Pseudomonas* spp. K10-2 и K10-3 выявил их идентичность (100%) с типовым видом *Pseudomonas umsongensis* Ps3-10, выделенным из кислых сельскохозяйственных почв в Корее. При культивировании вид отличался способностью восстанавливать нитраты и расти при 4°C [14]. На филогенетическом древе последовательности гена 16S рРНК штаммов *Pseudomonas* из озера Байкал и *P. umsongensis* Ps3-10 группировались в общий кластер (рисунок).

При сравнении нуклеотидной последовательности 16S рДНК *Rheinheimera* sp. K18 с последовательностями из банка данных определено высокое сходство (99,3%) с видом *Rheinheimera tilapiae* Ruye-90, изолированным из кишечника теляпии (*Tilapia rendalli*), культивируемой в пруду на Тайване [15]. Последовательность гена 16S рРНК штамма *Rheinheimera* sp. K18 образовала на древе сестринскую ветвь с *R. tilapiae* Ruye-90 (рисунок). Предварительно штамм *Rheinheimera* sp. K18 был отнесен к виду *R. tilapiae*.

Последовательность гена 16S рРНК штамма *Flavobacterium* sp. 43-09 из эпилитических биопленок озера Байкал сформировала сестринскую ветвь с антарктическим видом *Flavobacterium hibernum* ATCC 51468 (рисунок) [16]. При этом сходство генов 16S рРНК байкальского изолята и *F. hibernum* составило 98%, а с *Flavobacterium* sp. JRM, выделенным из ледового покрова реки Саскуэханна в США — 99,9%. Последний по данным полногеномного секвенирования назван *Flavobacterium falloni*. К этому же виду, очевидно, относится и выделенный нами штамм *Flavobacterium* sp. 43-09.

Идентификация генов PKS. Для исследованных шести штаммов гетеротрофных бактерий из озера Байкал определены 33 нуклеотидные последова-

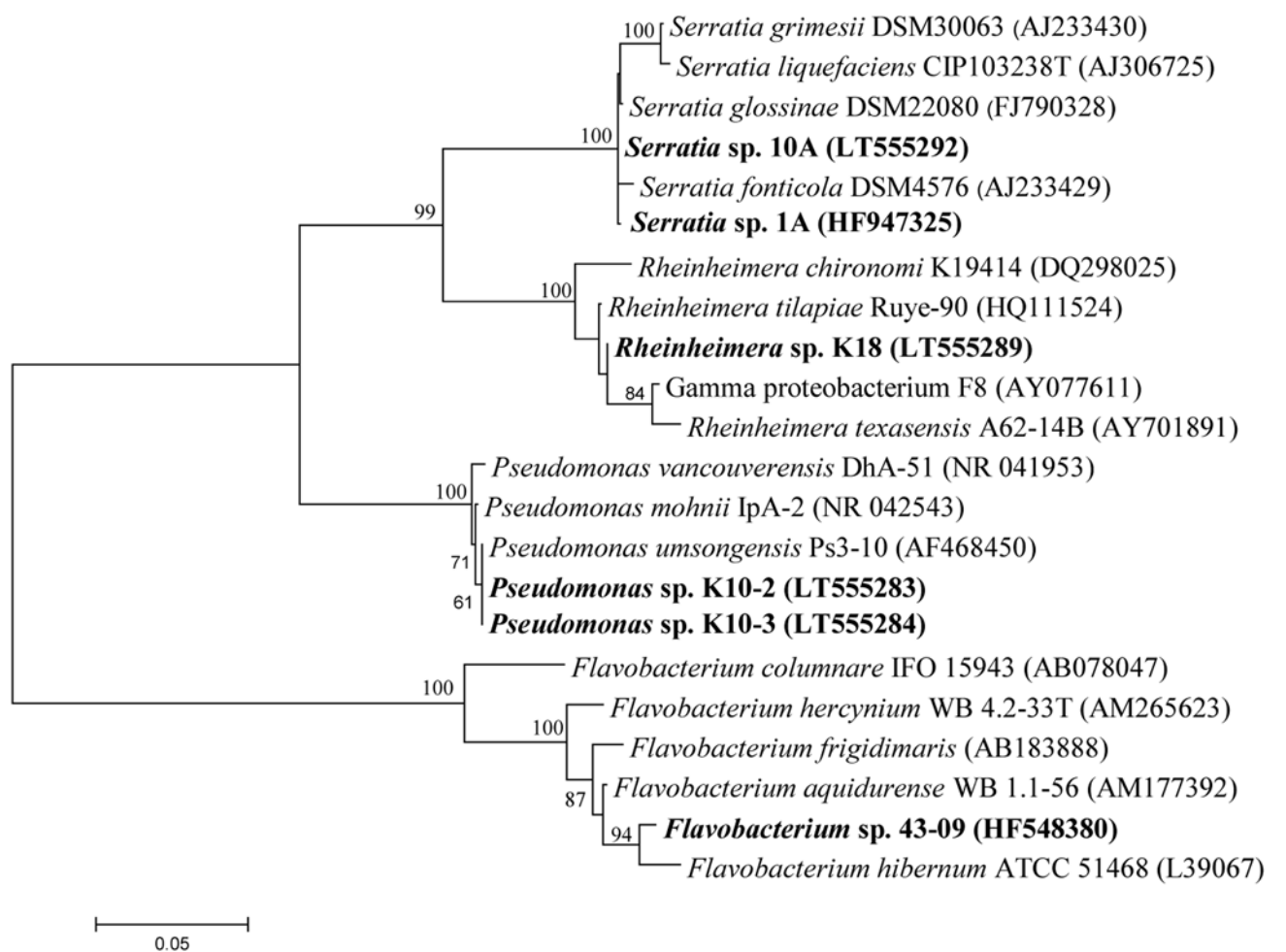


Рисунок. Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения фрагментов генов 16S рПНК длиной 1429 п.н. представителей родов *Serratia*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera* и *Flavobacterium*. Последовательности, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом

тельности генов PKS, которые сходны с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank на 72–100%. Ближайшие аминокислотные последовательности, выявленные с помощью BLASTP-анализа, представлены в табл. 1, идентифицированные PKS приведены в табл. 2.

Таблица 1

Ближайшие гомологи для последовательностей генов PKS микроорганизмов озера Байкал

Название штамма	Номер клона	Результаты BLASTP-анализа	
		Ближайшие гомологи	Гомология, %
<i>Serratia fonticola</i> 1A и 10A	1A-1; 1A-3; 1A-7; 1A-10; 1A-11; 1A-12; 1A-13; 10A-6; 10A-7	Поликетидсинтаза <i>Burkholderia</i> sp. TSV86 (WP_059568895)	80–81
	1A-2	Поликетидсинтаза <i>Burkholderia thailandensis</i> (WP_043296479)	82
	1A-4; 1A-6; 1A-9	Поликетидсинтаза <i>Burkholderia thailandensis</i> E264 (ABC38737)	85
	1A-5	Поликетидсинтаза <i>Enterobacter cloacae</i> (WP_063925842)	96
	10A-1; 10A-2; 10A-4; 10A-5; 10A-8	Поликетидсинтаза <i>Burkholderia thailandensis</i> (WP_059844334)	84–85
	10A-3	Поликетидсинтаза <i>Paenibacillus</i> sp. F6-B70 (ACT85958) Поликетидсинтаза <i>Paenibacillus polymyxa</i> (KJD37325)	73 72
<i>Pseudomonas umsongensis</i> K10-2 и K10-3	K10-2-1; K10-2-2; K10-3-1; K10-3-2; K10-3-6	Поликетидсинтаза <i>Pseudomonas putida</i> (ACN67520)	99–100

Окончание табл. 1

Название штамма	Номер клона	Результаты BLASTP-анализа	
		Ближайшие гомологи	Гомология, %
<i>Rheinheimera tilapiae</i> K18	K18-1; K18-2	Поликетидсинтаза <i>Rheinheimera</i> sp. F8 (ALZ75986)	93–94
	K18-3; K18-6	Поликетидсинтаза <i>Rheinheimera</i> sp. F8 (ALZ75984)	95
	K18-4; K18-5	Эритронолидсинтаза B Candidatus <i>Accumulibacter</i> sp. BA-92 (EX182404) Поликетидсинтаза <i>Achromobacter</i> sp. RTa (WP_043548713)	78 78
<i>Flavobacterium</i> sp. 43-09	43-09-9; 43-09-15	Поликетидсинтаза <i>Flavobacterium</i> sp. JRM (WP_039119622)	97–99

Таблица 2

Гомологи с идентифицированными ферментами, близкородственные байкальским последовательностям PKS

Название штамма	Номер клона	Результаты BLASTP-анализа	
		Гомологи с идентифицированными PKS	Гомология, %
<i>Serratia fonticola</i> 1A и 10A	1A-1; 1A-3; 1A-7; 1A-10; 1A-11; 1A-12; 1A-13; 10A-6; 10A-7	Ромидепсинсинтаза DepC <i>Chromobacterium violaceum</i> 968 (ABP57747); Спирухостатинсинтаза SpiC1 <i>Pseudomonas</i> sp. Q71576 (AFR69333)	80 78
	1A-2; 1A-4; 1A-6; 1A-9; 10A-1; 10A-2; 10A-4; 10A-5; 10A-8	Ромидепсинсинтаза DepB <i>Chromobacterium violaceum</i> 968 (ABP57746)	83
	1A-5	Дисоразолсинтаза DszA <i>Sorangium cellulosum</i> So ce12c (AAY32964)	50
	10A-3	Эритронолидсинтаза B <i>Dickeya</i> sp. NCPPB 3274 (WP_042861990)	70
		Диффицидинсинтаза DfnD <i>Bacillus</i> sp. 916 (EJD67453)	66
	K10-2-1; K10-2-2; K10-3-1; K10-3-2; K10-3-6	Эритронолидсинтаза B <i>Burkholderia</i> sp. BT03 (WP_024163149)	61
<i>Rheinheimera tilapiae</i> K18	K18-1; K18-2	Эритронолидсинтаза B <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 (WP_006892897)	66
		Миксаламидсинтаза MxaE <i>Stigmatella aurantiaca</i> (AAK57189)	64
	K18-3; K18-6	Миксатиазолсинтаза MtaB <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1 (AAF19810)	59
		Курацинсинтаза, CurL <i>Lyngbya majuscula</i> 19L (AAT70107)	58
	K18-4; K18-5	Эритронолидсинтаза B <i>Accumulibacter</i> sp. BA-92 (EX182404)	78
<i>Flavobacterium</i> sp. 43-09	43-09-9; 43-09-15	Дисоразолсинтаза DszA <i>Sorangium cellulosum</i> So ce12c (AAY32964)	57
		Кораллопиронинсинтаза CorB <i>Coralloccoccus coralloides</i> B035 (ADI59532)	56

Для штаммов *S. fonticola* 1A и 10A идентифицировано 12 и 8 последовательностей генов PKS, соответственно. Наибольшее сходство (72–96%) определенных нуклеотидных последовательностей наблюдается с генами бактерий родов *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter* и *Paenibacillus* (табл. 1). Среди родственных последовательностей были определены гены, кодирующие синтез антибиотиков (эритромицин, диффицидин) и противоопухолевых

агентов (ромидепсин, спирухостатин, дисоразол). Процент гомологии последовательностей генов PKS *S. fonticola* с известными ферментами был относительно низким (50–83%) (табл. 2). Ранее для *S. fonticola* 1A показано наличие антагонистической активности против четырех условно-патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli* M17-02, *Bacillus subtilis* ВКПМ, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* [17].

Восемнадцать последовательностей генов PKS штаммов *S. fonticola* 1A и 10A на 80–83% сходны с генами синтеза цитостатика ромидепсина (DepC и DepB). Ромидепсин — бициклический депсипептид, выделенный в 1994 г. в Японии из почвенной бактерии *Chromobacterium violaceum*. Это соединение производится фирмой Celgene как противоопухолевый лекарственный препарат “Истодакс” (Istodax) для лечения Т-клеточной лимфомы кожи и других периферических Т-клеточных лимфом. Ромидепсин ингибирует активность фермента гистон-ацетилазы и, таким образом, индуцирует апоптоз лимфоцитов. Согласно последним исследованиям ромидепсин может быть использован для реактивации скрытого вируса иммунодефицита человека с целью истощения его популяции [18].

Некоторые виды *Serratia*, такие как *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. marcescens* и *S. nematodiphila*, образуют красный пигмент — продигиозин, представляющий собой алкалоидное соединение с антимикробными, противомаларийными, противоопухолевыми и иммунодепрессантными свойствами [19]. Кроме того, штаммы рода *Serratia* производят и другие полезные вторичные метаболиты, включая ооцидин А, карбапенем, альтиомицин, бактериоцины и серравиттины [19]. Серравиттины относятся к биоразлагаемым неионогенным поверхностно-активным веществам, чрезвычайно востребованным в промышленности. Новый почвенный вид *Serratia surfactantifaciens* sp., одновременно продуцирующий продигиозин и серравиттин, проявляет противомикробную активность, ингибирует развитие опухолей и полезен для биоремедиации [19].

В геномах штаммов *P. umsongensis* K10-2 и K10-3 идентифицированы 2 и 3 последовательности генов PKS, соответственно (табл. 1). Среди ближайших гомологов (99–100%) определена PKS типа I (ACN67520) из *Pseudomonas putida*, а также KS-домен кластеров биосинтеза эритромицина из *Burkholderia* sp. BT03 с гомологией 61% (табл. 2). Исследуемые штаммы рода *Pseudomonas* могут быть потенциально способными к синтезу новых БАВ, поскольку бактерии данного рода продуцируют 795 вторичных метаболитов, включая 610 антибиотиков и 185 веществ с широким спектром действия [19]. В числе продуцируемых соединений: мупироцин, пиролес, пирролидиндион, фторглюцинол, феназин, бензальдегид, хинолин, хинолон, фенантрен, фталат, римид, мурамиды, зафрин и бушрин [20, 21]. В байкальском штамме *P. fluorescens* 28Bb-06, выделенном из губки, обнаружены гены PKS, на 50–66% сходные с генами биосинтеза ерсиниабактина, ризоксина, дисоразола и эпотилона [22].

Для штамма *R. tilapiae* K18 предсказано шесть аминокислотных последовательностей PKS. Среди ближайших гомологов (93–95%) выявлены гены PKS, принадлежащие штамму *Rheinheimera* sp. F8, их последовательности определены в результате полно-

геномного секвенирования (табл. 1). Особенностью штамма *Rheinheimera* sp. F8, изолированного из биопленок реки Саскачеван (Канада), является образование стабильных нитей внеклеточной ДНК [23]. В числе последовательностей, родственных последовательностям байкальского штамма (с гомологией 58–78%), обнаружены гены PKS, синтезирующие антибиотики: эритромицин, миксаламид, курацин и миксотиазол (табл. 2). В настоящий момент метаболиты, синтезируемые PKS, у бактерий рода *Rheinheimera* не выявлены.

Две последовательности гена PKS определены в геноме штамма *Flavobacterium* sp. 43-09, они имеют высокую степень гомологии (97–99%) с генами PKS *Flavobacterium* sp. JRM (табл. 1). Таким образом, не только ген 16S рPHK, но и гены PKS являются близкородственными, что свидетельствует в пользу синонимичности штаммов *Flavobacterium* sp. 43-09 и *Flavobacterium* sp. JRM. Кроме того, в числе сходных последовательностей обнаружены гены синтеза антибиотика кораллопиронина и дисоразола (табл. 2), однако гомология с этими генами составила только 56–57%. В настоящее время не имеется сведений о синтезе вторичных метаболитов у представителей рода *Flavobacterium*. В геноме штамма *Flavobacterium* sp. TAB 87, выделенном из антарктических морских проб, найдено два кластера генов PKS типов I и III [24]. Таким образом, гены PKS детектируются в геномах *Flavobacterium*, однако БАВ, которые синтезируются данными PKS, не описаны; возможно, это вторичные метаболиты с новыми уникальными функциями.

Впервые в геномах бактерий *S. fonticola*, *P. umsongensis*, *R. tilapiae* и *Flavobacterium* sp., выделенных из эпиплитических биопленок озера Байкал, определены гены PKS, родственные генам биосинтеза антибиотиков (диффицидина, эритромицина, курацина, миксаламида, кораллопиронина, миксатиазола) и цитостатиков (ромидепсина, спирохостатина, дисоразола). Невысокий процент гомологии (50–83%) с известными генами PKS свидетельствует о потенциальной способности исследуемых штаммов продуцировать ряд новых, до настоящего времени еще не описанных, БАВ. Таким образом, исследуемые байкальские штаммы могут представлять практический интерес для биотехнологии. Для подтверждения наших предположений необходимо выделить индивидуальные соединения и установить их структуру, а также провести исследования их биологической активности.

Авторы выражают благодарность к.б.н. С.В. Кирильчику за помощь в проведении секвенирования.

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме №0345-2016-0003 и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-54-44035).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu X.-C., Qian C.D., Fang H.H., Wen Y.P., Zhou J.Y., Zhan Z.J., Ding R., Li O., Gao H. Paenimacrolidin, a novel macrolide antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6-B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Microb. Biotechnol. 2011. Vol. 4. N 4. P. 491–502.
2. Sponga F., Cavaletti L., Lazzarini A., Borghi A., Ciciliato I., Losi D., Marinelli F. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms // J. Biotechnol. 1999. Vol. 70. N 1. P. 65–69.
3. Palomo S., González I., de la Cruz M., Martín J., Torro J.R., Anderson M., Hill R.T., Vicente F., Reyes F., Geniloud O. Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11. N 4. P. 1071–1086.
4. Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Biofilm – “City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? // Microbiology. 2007. Vol. 76. N 2. P. 125–138.
5. Bartrons M., Catalan J., Casamayor E.O. High bacterial diversity in epilithic biofilms of oligotrophic mountain lakes // Microb. Ecol. 2012. Vol. 64. N 4. P. 860–869.
6. Staunton J., Wilkinson B. Combinatorial biosynthesis of polyketides and non-ribosomal peptides // Curr. Opin. Chem. Biol. 2001. Vol. 5. N 2. P. 159–164.
7. Banskota A.H., Mcalpine J.B., Sørensen D., Ibrahim A., Aoudate M., Pirae M., Alarco A.M., Farnet C.M., Zazopoulos E. Genomic analyses lead to novel secondary metabolites. Part 3. ECO-0501, a novel antibacterial of a new class // J. Antibiot. (Tokyo). 2006. Vol. 59. N 9. P. 533–542.
8. Kaluzhnaya O.V., Kulakova N.V., Itskovich V.B. Diversity of polyketide synthase (PKS) genes in metagenomic community of freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis* // Mol. Biol. (Moscow). 2012. Vol. 46. N 6. P. 790–795.
9. Kaluzhnaya O.V., Itskovich V.B. Distinctive features of the microbial diversity and the polyketide synthase genes spectrum in the community of the endemic Baikal sponge *Swartschewskia papyracea* // Russ. J. Genet. 2016. Vol. 52. N 1. P. 38–48.
10. Калужная Ок.В., Липко И.А., Ицкович В.Б., Калужная О.В., Парфенова В.В. ПЦР-скрининг бактериальных культур, выделенных из пресноводной губки *Lubomirskia baicalensis*, на наличие генов синтеза вторичных метаболитов // Вода: химия и экология. 2013. № 7. С. 70–74.
11. Geiger A., Fardeau M.-L., Falsen E., Ollivier B., Cuny G. *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis* // Int. J. Syst. Evol. Microb. 2010. Vol. 60. N 6. P. 1261–1265.
12. Gavini F., Ferragut C., Izard D., Trinel P.A., Leclerc H., Lefebvre B., Mossel D.A.A. *Serratia fonticola*, a new species from water // Int. J. Syst. Bact. 1979. Vol. 29. N 2. P. 92–101.
13. Kampf P., Glaeser S.P. *Serratia glossinae* Geiger et al. 2010 is a later synonym of *Serratia fonticola* Gavini et al. 1979 // Int. J. Syst. Evol. Microb. 2015. Vol. 65. N 5. P. 1406–1408.
14. Kwon S.W., Kim J.S., Park I.C., Yoon S.H., Park D.H., Lim C.K., Go S.J. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsungensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea // Int. J. Syst. Evol. Microb. 2003. Vol. 53. N 1. P. 21–27.
15. Chen W.-M., Yang S.-H., Young C.-C., Sheu S.-Y. *Rheinheimera tilapia* sp. nov., isolated from a freshwater culture pond // Int. J. Syst. Evol. Microb. 2013. Vol. 63. N 4. P. 1457–1463.
16. McCammon S.A., Innes B.H., Bowman J.P., Franzmann P.D., Dobson S.J., Holloway P.E., Skerratt J.H., Nichols P.D., Rankint L.M. *Flavobacterium hibernum* sp. nov., a lactoseutilizing bacterium from a freshwater Antarctic // Int. J. Syst. Bact. 1998. Vol. 48. N 4. P. 1405–1412.
17. Зименс Е.А., Суханова Е.В., Штыкова Ю.П., Парфенова В.В., Белькова Н.Л. Антагонистическая активность гетеротрофных микроорганизмов из биопленок на твердых субстратах литоральной зоны озера Байкал // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биол., Экол. 2014. Т. 7. С. 91–98.
18. Sogaard O.S., Graversen M.E., Leth S. et al. The depsipeptide romidepsin reverses HIV-1 latency *in vivo* // PLoS Pathogens. 2015. Vol. 11. N 9. e1005142.
19. Su C., Xiang Z., Liu Y., Zhao X., Sun Y., Li Z., Li L., Chang F., Chen T., Wen X., Zhou Y., Zhao F. Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantfaciens* sp. nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2 // BMC Genomics. 2016. Vol. 17. N 1, 865.
20. Isnansetyo A., Kamei Y. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas* // Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 36. N 10. P. 1239–1248.
21. Gurney R., Thomas C.M. Mupirocin: biosynthesis, special features and applications of an antibiotic from a gram-negative bacterium // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. Vol. 90. N 1. P. 11–21.
22. Lipko I.A., Kalyuzhnaya O.V., Kravchenko O.S., Parfenova V.V. Identification of polyketide synthase genes in genome of *Pseudomonas fluorescens* strain 28Bb-06 from freshwater sponge *Baikalospongia bacillifera* // Mol. Biol. (Mosc.). 2012. Vol. 46. N 4. P. 609–611.
23. Bockelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T.R., Wecke J., Lawrence J.R., Szejczyk U. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure // FEMS Microbiol. Lett. 2006. Vol. 262. N 1. P. 31–38.
24. Presta L., Inzucchi I., Bosi E., Fondi M., Perrin E., Miceli E., Tutino M.L., Lo Giudice A., de Pascale D., Fani R. Draft genome sequence of *Flavobacterium* sp. strain TAB 87, able to inhibit the growth of cystic fibrosis bacterial pathogens belonging to the *Burkholderia cepacia* complex // Genome Announc. 2016. Vol. 4. N 3. e00410–16.

Поступила в редакцию
19.05.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

MOLECULAR BIOLOGY

DIVERSITY OF POLYKETIDE SYNTHASE GENES IN THE GENOMES
OF HETEROTROPHIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM EPILITHIC BIOFILMS
IN LAKE BAIKAL*E.V. Sukhanova**, *E.A. Zimens*, *V.V. Parfenova*, *O.I. Belykh**Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ulan-Batorskaya ul. 3, Irkutsk, 664033, Russia***email: sukhanovalena17@gmail.com*

Many bacterial secondary metabolites including pharmacologically promising compounds are synthesized by polyketide synthases (PKS) enzyme complexes. Nucleotide sequences of genes encoding 16S rRNA and PKS of heterotrophic bacterial strains isolated from epilithic biofilms in the littoral zone of Lake Baikal were determined. Based on molecular phylogenetic analysis of 16S rRNA genes, we identified six heterotrophic strains: *Serratia fonticola* 1A and 10A, *Pseudomonas umsongensis* K10-2 and K10-3, *Rheinheimera tilapia* K18 and *Flavobacterium* sp. 43-09. Sequencing of cloned amplification products for PKS gene cluster revealed 33 sequences. Genes involved in biosynthesis of antibiotics (difficidine, erythromycin, curacin, mixalamide, coralopyronin, and myxothiazol) and cytostatics (romidepsin, spiruchostatin, and disorazol) were determined among related sequences. The low homology (50–83%) of amino acid sequences of PKS in Baikal bacteria with sequences in GenBank attests to potential capability of strains to produce new, yet not studied polyketide substances. The results obtained show that the strains under investigation may be of practical interest for biotechnological application.

Keywords: *polyketide synthase genes, 16S rRNA, heterotrophic microorganisms, Lake Baikal, cloning, epilithic biofilms*

Сведения об авторах

Суханова Елена Викторовна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-42-54-15;
e-mail: sukhanovalena17@gmail.com

Зименс Екатерина Андреевна — вед. инженер лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-42-54-15;
e-mail: ekaterinasiemens93@gmail.com

Парфенова Валентина Владимировна — канд. биол. наук, доц., зав. лабораторией водной микробиологии Лимнологического института СО РАН

Бельх Ольга Ивановна — канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотр., зав. лабораторией водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-42-54-15;
e-mail: belykh@lin.irk.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

РОЛЬ БЕЛКА NHP6 В ТРАНСКРИПЦИИ НУКЛЕОСОМ *IN VITRO*

Ф.К. Хсиех¹, А.Л. Козлова^{2,*}, Н.С. Герасимова²,
Е.Ю. Котова³, Т. Формоза⁴, В.М. Студитский^{2,3}

¹Department of Molecular Biology, Harvard Medical School, 25 Shattuck St., Boston, MA 02114, USA;

²кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

⁴University of Utah, School of Medicine, 30 N 1900 E, Salt Lake City, Utah, UT 84132, USA

*e-mail: mika.lorens@yandex.ru

Nhp6 — это небольшой белок дрожжей, неспецифично связывающий ДНК. Ранее было показано, что Nhp6 входит в состав нескольких комплексов (в том числе комплекса FACT), присутствует на многих дрожжевых промоторах и транскрибируемых участках генов *in vivo* и участвует в процессе дестабилизации структуры нуклеосом *in vitro*. В нашей лаборатории был изучен фактор FACT и показана его роль в транскрипции хроматина эукариотической РНК-полимеразой 2 *in vitro*, однако роль белка Nhp6 в транскрипции ранее не была исследована. В данной работе мы изучили влияние этого белка на транскрипцию нуклеосом эукариотической РНК-полимеразой 2 и показали, что он увеличивает эффективность транскрипции в нескольких положениях на нуклеосомной ДНК, в первую очередь — участка в положении +(11–17) в нуклеосоме. Предложена модель действия Nhp6, предполагающая стабилизацию транзитного отворачивания ДНК от октамера гистонов в процессе транскрипции хроматина.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, транскрипция, FACT, Nhp6, Spt16, Pob3

Хроматин — это сложный нуклеопротеидный комплекс, структурной единицей которого на первом уровне упаковки является нуклеосома [1], состоящая из октамера белков-гистонов и нуклеосомной ДНК. Нуклеосомы участвуют в регуляции биологических процессов на ДНК.

Шаперон гистонов FACT (*facilitates chromatin transcription*) играет важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина в ходе различных процессов с участием ДНК — репликации, репарации и транскрипции [2]. Наиболее исследованы комплексы FACT человека (*human FACT* — hFACT) и дрожжей (*yeast FACT* — yFACT).

yFACT — гетеротример, состоящий из белков Spt16 (*suppressor of TY16*), Pob3 (*poll binding protein 3*) и Nhp6 (*non histone protein 6*) [3] (рис. 1, А). В нашей лаборатории методом spFRET-микроскопии *in vitro* был подробно изучен механизм yFACT-зависимого разворачивания (реорганизации) нуклеосомной ДНК. Данное разворачивание проходит по механизму “все или ничего” — нуклеосомы при взаимодействии с комплексом находятся либо в полностью интактном состоянии, либо в реорганизованном [4]. Была доказана роль Nhp6 в отворачивании ДНК: присутствие в растворе только субъединиц Spt16 и Pob3 не вызывало реорганизацию нуклеосом [4].

Исследования на клетках дрожжей показали, что yFACT колокализуется с РНК-полимеразой 2 (РНКП2) [5] и необходим во время выполняемой

ей транскрипции для поддержания структуры хроматина [6, 7]. Скорее всего, FACT нужен для транскрибирования генов в районах с упорядоченной структурой хроматина [8]. Исследования *in vitro* показали, что hFACT облегчает движение РНК-полимеразы через нуклеосомы [9]. Возможно, FACT конкурирует с ДНК за связывание гистонов во время элонгации транскрипции. Таким образом, исследования *in vitro* и *in vivo* подтверждают, что FACT способствует более эффективному сохранению нуклеосом в процессе транскрипции.

В настоящей работе мы исследовали одну из субъединиц комплекса FACT — Nhp6. Это небольшой белок дрожжей с молекулярной массой 10,81 кДа (93 и 100 а.о. в разных формах), неспецифично связывающий ДНК [10]. Nhp6 связывается с небольшим участком ДНК и образует мультимолекулярные комплексы при взаимодействии с ДНК длиной 149 п.н *in vitro* [11]. Также было показано, что Nhp6 важен для ослабления ДНК-гистоновых взаимодействий в нуклеосомах [12].

Роль Nhp6 в транскрипции была продемонстрирована в работах по индукции генов, транскрибирующихся РНКП2, в мутантных по генам *nhr6a* и *nhr6b* штаммах дрожжей; экспрессия исследуемых генов была подавлена [13]. Кроме этого, Nhp6 облегчает взаимодействие ТВР (TATA-box binding protein) с ДНК в присутствии ТФИИ (Transcription Factor IIА) [14]. Полногеномный анализ распределения Nhp6 по дрожжевому геному показал, что Nhp6 распо-

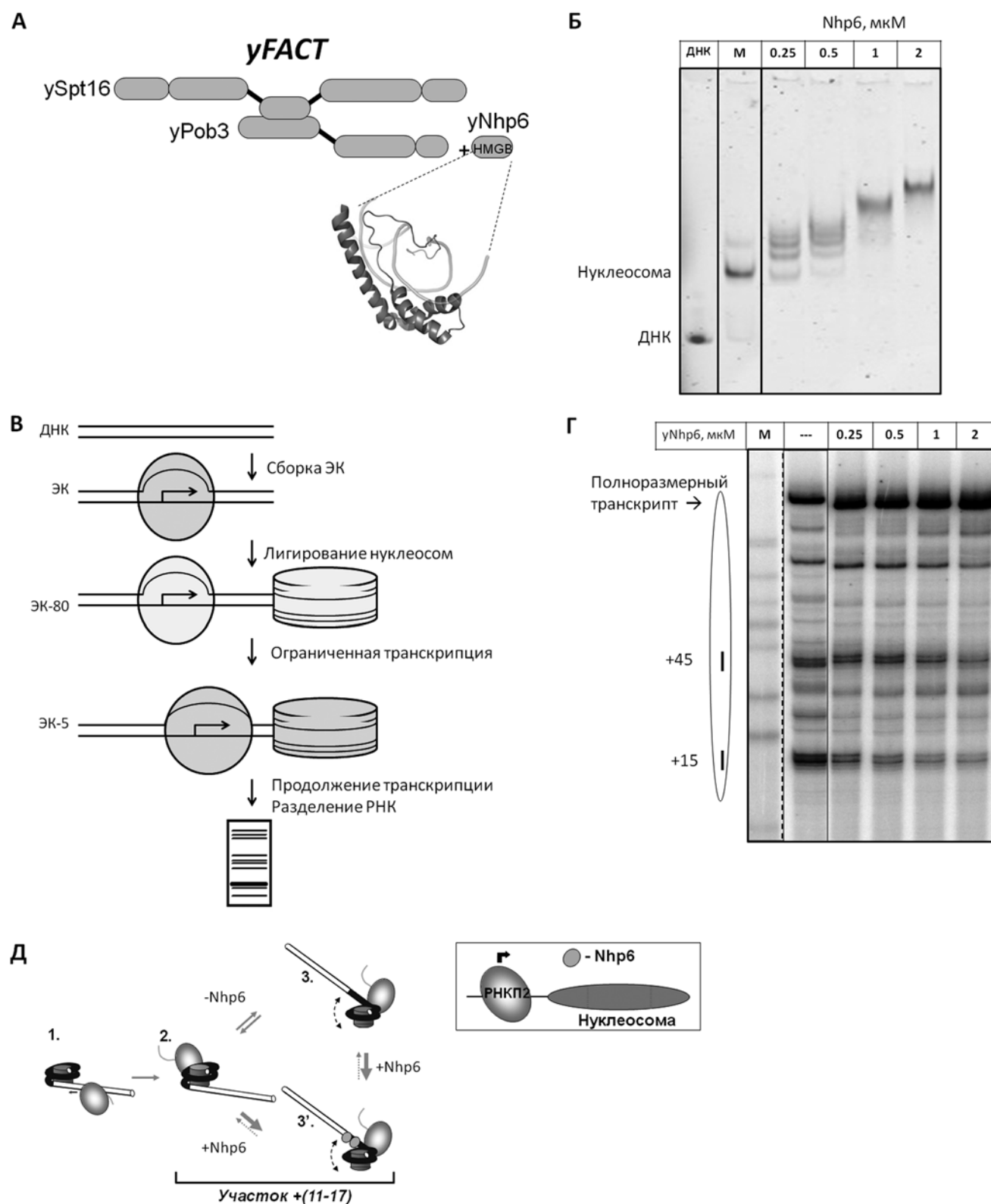


Рисунок. Белок Nhp6 облегчает транскрипцию нуклеосом РНКП 2. **А** – Субъединичная структура белкового комплекса yFACT. Показана доменная структура белков Spt16, Pob3 и HMGB-подобного ДНК-связывающего домена субъединицы Nhp6 в комплексе с ДНК (PDB ID – 1J5N). **Б** – Взаимодействие Nhp6 с нуклеосомами. Нуклеосомы инкубировали в присутствии указанных концентраций Nhp6 и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в нативных условиях. Слева указаны значения электрофоретической подвижности нуклеосом и ДНК. **В** – Схема эксперимента: транскрипция нуклеосом эукариотической РНКП 2 (обозначена на рисунке овалом) в присутствии белка Nhp6 *in vitro*. **Г** – Транскрипция нуклеосом эукариотической РНКП 2 в присутствии белка Nhp6 *in vitro*. **Д** – Модель транскрипции в присутствии Nhp6. Показана модель, объясняющая облегчение транскрипции нуклеосом белком Nhp6: РНК-полимераза 2 откручивает ДНК от октамера гистонов, Nhp6 связывает данный участок ДНК, затрудняя обратное связывание ДНК с октамером, и таким образом облегчает транскрипцию нуклеосом

ложен на транскрибируемых участках 104 генов, транскрибируемых РНКП2 [15], но его роль в транскрипции хроматина РНКП2 *in vitro* не была изучена.

Материалы и методы

Сборка нуклеосом. Получение позиционированных моноклеосом проводили по протоколам, описанным ранее [16, 17].

Инкубация нуклеосом с белком Nhp6. К нуклеосомам, содержащим меченую ДНК (10–15 нМ), добавляли Nhp6 (от 0,25 до 2 мкМ в различных экспериментах) и инкубировали 10 мин при 30°C. Инкубация проводилась в транскрипционном буфере TB150 (20 мМ Трис-НСl (рН 7,9), 2 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 1 мМ бета-меркаптоэтанол). Связывание белка Nhp6 анализировали с помощью электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (акриламид:бисакриламид – 39:1), проводимом в нативных условиях при 4°C (электродный буфер 0,5хТВЕ).

Транскрипция *in vitro*. РНКП2 дрожжей и гистоны очищали по протоколам, описанным ранее [18, 19]. Элонгационный комплекс с дрожжевой РНКП2 собирали с использованием коротких синтетических ДНК- и РНК-фрагментов и лигировали с нуклеосомами. Транскрипцию проводили с дополнительным мечением изотопом α -³²P РНК-транскриптов до (–5)-нуклеотида относительно входа в нуклеосому, затем элонгация начиналась при добавлении в раствор недостающих нуклеотидов и избытка ГТФ, не содержащего метки, в буфере, содержащем 150 мМ KCl, при указанных концентрациях Nhp6. Исследуемый диапазон концентраций Nhp6 составлял 0,25–2 мкМ. После прохождения транскрипции РНК анализировали гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. В качестве маркера использовали плазмиду pBR332, обработанную эндонуклеазой рестрикции MspI [9].

Результаты и обсуждение

Одна молекула Nhp6 (рис. 1, А) связывается с участком ДНК длиной около 10–15 п.н. [10]; таким образом, с длинными фрагментами ДНК белок может образовывать мультимолекулярные комплексы. Ранее это было подтверждено в экспериментах, проведенных на последовательностях ДНК, обладающих низкой аффинностью к гистоновому октамеру [11]; необходимо было доказать образование мультимолекулярных комплексов с Nhp6 высокоаффинной ДНК, используемой в наших экспериментах. Были изучены комплексы, образуемые Nhp6 с нуклеосомной ДНК (рис. 1, Б). ДНК-фрагмент для этого эксперимента состоял из нуклеосомопозиционирующей последовательности (НПП) и дополнительного промотора – такая матрица моделировала ДНК, используемую в последующих транскрипционных опытах; таким образом, в этом эксперименте изучалось связывание белка Nhp6

как с участками, связанными с гистонами (НПП), так и со свободными участками ДНК (промоторная область). Нуклеосомы инкубировали в присутствии повышающихся количеств (от 0,25 до 2 мкМ) белка Nhp6. Образование ДНК-белковых комплексов фиксировали по изменению электрофоретической подвижности в нативном ПААГ нуклеосом, содержащих флуоресцентно-меченную ДНК.

При взаимодействии Nhp6 с нуклеосомной ДНК наблюдается формирование мультимолекулярных комплексов, отличающихся по электрофоретической подвижности в ПААГ в нативных условиях, как было описано ранее для нуклеосом, ДНК которых не содержала НПП [11]. При постепенном повышении концентрации белка от 0,25 до 2 мкМ было выявлено последовательное образование нескольких мультимолекулярных комплексов (рис. 1, Б). Каждый такой комплекс состоит из одной нуклеосомы и одной или нескольких молекул Nhp6. Сравнение эффективности связывания Nhp6 с нуклеосомами, ДНК которых содержит НПП (рис. 1, Б), с опубликованными ранее данными [11] показало, что наличие НПП не оказывает существенного влияния на связывание Nhp6 с нуклеосомами. Таким образом, наша экспериментальная система может быть использована для анализа роли Nhp6 в транскрипции нуклеосом.

Для изучения влияния Nhp6 на процесс элонгации с помощью эукариотической РНКП2 в хроматине проводили анализ РНК-продуктов, полученных в ходе транскрипции моноклеосомных матриц РНКП2 в присутствии повышающихся концентраций белка Nhp6 *in vitro* (рис. 1, В).

По результатам транскрипции *in vitro* удалось установить, что уже при низкой концентрации Nhp6 (0,25 мкМ) наблюдается уменьшение “паузирования” РНКП2 (временных остановок РНКП2 на ДНК-матрице) при элонгации участка +15 нуклеосомной ДНК. При более высоких концентрациях Nhp6 (1 и 2 мкМ) наблюдается также увеличение эффективности транскрипции участка +45 (рис. 1, Г).

На основе полученных данных нами была предложена возможная модель роли Nhp6 в элонгации (рис. 1, Д). Данный белок, связываясь с нуклеосомной ДНК, может изменять ее структуру: вызывать сильные изгибы в месте связывания и отгибать ДНК от октамера гистонов. Эти эффекты приводят к облегчению транскрипции в первую очередь при входе в нуклеосому (положение +15, рис. 1, Г, Д), а также при больших концентрациях могут влиять на “паузирование” РНКП2 в ходе элонгации через участок +45. В клетках дрожжей субъединица Nhp6 присутствует в избытке по отношению к остальным субъединицам фактора FACS [10]. Поэтому полученные нами данные позволяют предположить, что субъединица Nhp6 дрожжевого комплекса FACS может участвовать в транскрипции хроматина в клетках дрожжей как в составе комп-

лекса FACT, так, возможно, и как отдельная субъединица, облегчающая транскрипцию хроматина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg R.D., Tomas J.O. Chromatin Structure: Oligomers of the Histones // *Science*. 1973. Vol. 184. N 4139. P. 865–868.
2. Bondarenko M.T., Maluchenko N.V., Valieva M.E., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Georgiev P.G., Studitsky V.M. Structure and function of histone chaperone FACT // *Mol. Biol.* 2015. Vol. 49. N 6. P. 796–809.
3. Formosa T., Eriksson P., Wittmeyer J., Ginn J., Yu Y., Stillman D.J. Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. N 13. P. 3506–3517.
4. 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.
5. Saunders A., Werner J., Andrulis E.D., Nakayama T., Hirose S., Reinberg D., Lis J.T. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo* // *Science*. 2003. Vol. 301. N 5636. P. 1094–1096.
6. Mason P.B., Struhl K. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation *in vivo* // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23. N 22. P. 8323–8333.
7. Cheung V., Chua G., Batada N.N., Landry C.R., Michnick S.W., Hughes T.R., Winston F. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome // *PLoS Biol.* 2008. Vol. 6. N 11. P. 277–281.
8. Reinberg D., Sims R.J. De FACTo nucleosome dynamics // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. N 33. P. 23297–23301.
9. Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. N 19. P. 7654–7659.
10. Stillman D.J. Nhp6: A small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1799. N 1–2. P. 175–180.
11. Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 46. P. 45288–45295.
12. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 35. N 3. P. 365–376.
13. Yu Y., Eriksson P., Stillman D.J. Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. N 7. P. 2350–2357.
14. Biswas D., Imbalzano A.N., Eriksson P., Yu Y., Stillman D.J. Role for Nhp6, Gcn5, and the Swi/Snf complex in stimulating formation of the TATA-binding protein-TFIIA-DNA complex // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24. N 18. P. 8312–8321.
15. Dowell N.L., Sperling A.S., Mason M.J., Johnson R.C. Chromatin-dependent binding of the *S. cerevisiae* HMGB protein Nhp6A affects nucleosome dynamics and transcription // *Genes. Dev.* 2010. Vol. 24. N 18. P. 2031–2042.
16. 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.
17. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.
18. Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V.A., Kashlev V., Studitsky V.M. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: Loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell.* 2002. Vol. 9. N 3. P. 541–552.
19. Dyer P.N., Edayathumangalam R.S., White C.L., Bao Y., Chakravarthy S., Muthurajan U.M., Luger K. Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA // *Methods Enzymol.* 2004. Vol. 375. P. 23–44.

Поступила в редакцию
06.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

MOLECULAR BIOLOGY

ROLE OF NHP6 PROTEIN IN TRANSCRIPTION THROUGH A NUCLEOSOME *IN VITRO*

F.K. Hsieh¹, A.L. Kozlova^{2,*}, N.S. Gerasimova², E. Kotova³, T. Formosa⁴, V.M. Studitsky^{2,3}

¹Department of Molecular Biology, Harvard Medical School, 25 Shattuck St., Boston, MA 02114, USA;

²Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;

³Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333,
Philadelphia, PA 19111, USA;

⁴University of Utah, School of Medicine, 30 N 1900 E, Salt Lake City, Utah, UT 84132, USA

*e-mail: mika.lorens@yandex.ru

Nhp6 is a small yeast protein, which binds DNA nonspecifically. It was shown that Nhp6 is a part of several protein complexes (including FACT complex) and is presented on many yeast promoters and transcribed regions of genes *in vivo*. It also participates in the process of destabilizing the structure of nucleosomes *in vitro*. In our laboratory, we studied FACT complex

and showed its role in the transcription of eukaryotic RNA-polymerase 2 *in vitro*, but the role of the Nhp6 protein in transcription has not been studied previously. In this paper, we describe the effect of Nhp6 protein on transcription through a nucleosome by eukaryotic RNA-polymerase 2 and show that Nhp6 protein increases the transcription efficiency at several positions on the nucleosomal DNA, primarily the transcription at the positions +(11–17) in the nucleosome. We proposed a model of the action of Nhp6 during transcription through chromatin, suggesting the stabilization of DNA transiently uncoiled from the octamer during this process.

Keywords: *chromatin, nucleosome, transcription, FACT, Nhp6, Spt16, Pob3*

Сведения об авторах

Хсиех Фу Кай — PhD, науч. сотр. Медицинского факультета Гарвардского университета. Тел.: +1-617-432-1000; e-mail: hsieh@molbio.mgh.harvard.edu

Козлова Анастасия Львовна — студентка кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: mika.lorens@yandex.ru

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: shordome@gmail.com

Котова Елена Юрьевна — науч. сотр. кафедры эпигенетики рака Онкологического центра Фокс Чейз. Тел.: +1-215-728-7014, e-mail: elena.kotova@fccc.edu

Формоза Тим — PhD, проф. кафедры биохимии медицинского факультета университета Юты. Тел: +1-801-581-7201; e-mail: tim@biochem.utah.edu

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

ЕСТЬ ЛИ У СТАРЕНИЯ ЦЕЛЬ?

А.Н. Хохлов*, А.А. Клебанов, Г.В. Моргунова

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

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

Кратко рассматриваются представления сторонников и противников запрограммированности старения о целесообразности этого явления для эволюции живых организмов. Мы полагаем, что у эволюции нет никакой “геронтологической” цели, ибо обязательное ограничение клеточной пролиферации в процессе развития многоклеточных организмов является фактором, “автоматически” запускающим старение из-за накопления в клетках различных макромолекулярных повреждений вследствие торможения или даже полного прекращения возникновения новых, неповрежденных, клеток. Это ведет к подавлению “разбавления” стохастических повреждений (наиболее важными из которых являются повреждения ДНК) на уровне всей клеточной популяции. Перечисляются также некоторые дополнительные доводы в пользу нецелесообразности старения как для вида, так и для индивида.

Ключевые слова: старение, эволюция, естественный отбор, продолжительность жизни, развитие, клеточная пролиферация

В последние годы вновь активизировалась дискуссия между сторонниками запрограммированности старения и их оппонентами, считающими старение следствием стохастического накопления различных повреждений в организме [1–8]. С позиции большинства “программистов”, опирающихся на представления “раннего” Вейсмана [9] (который, кстати, впоследствии кардинально пересмотрел свои взгляды [10]), этот феномен возник в процессе эволюции как средство устранения из популяции старых особей, дабы они не конкурировали с молодыми за ресурсы и жизненное пространство, а также не замедляли “ротацию” индивидов, обеспечивающую прогрессивную модификацию видов. Иными словами, постулируется ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ для вида в целом старения отдельных особей. При этом, согласно известной точке зрения [1], люди, являющиеся существами социальными, уже не участвуют в естественном отборе, а программа старения для них не имеет никакого смысла и может быть “отключена” с помощью достижений современной геронтологии.

В то же время, противники запрограммированности старения подчеркивают, что в большинстве случаев эволюция направлена на совершенствование индивидов, благополучие которых и определяет благополучие всего вида. Именно поэтому продолжительность жизни в процессе эволюции, как правило, увеличивалась. Кроме того, у многих животных, особенно высокоорганизованных (приматы, слоны и др.), и человека преимущества долгой жизни (“эффект бабушек”, возможность длительного обучения, передача опыта от поколения к поколению и т.п.) обычно многократно компенсируют связанные с ней проблемы.

Впрочем, нельзя не согласиться с тем, что определенную “пользу” старение человеческому обществу может все-таки приносить, так как именно с его помощью в основном идет высвобождение должностей, занимаемых людьми, достигшими значительного возраста. Чем дольше в среднем живут люди в конкретной стране, тем сложнее молодым талантливым специалистам рассчитывать на скорое повышение по службе. Известно, что при полном отсутствии старения и вымирании людей “по экспоненте”, т.е. в результате исключительно несчастных случаев и летальных болезней, средняя продолжительность жизни человека составила бы 700–800 лет [11]. Трудно себе даже представить, каким образом в таком случае обеспечивался бы карьерный рост представителей молодого поколения. А уж их шансы стать академиками просто стремились бы к нулю! Однако в данном случае речь идет не о биологической, а о социальной эволюции, аспектов которой мы в этой статье не касаемся.

Согласно концепции старения, неоднократно представленной нами в целом ряде работ (см., например, [7, 11–13]), ограничение пролиферации клеток, образующих ткани и органы подавляющего большинства многоклеточных организмов, является следствием накопления в них различных макромолекулярных дефектов. При этом наиболее важные из них – это повреждения ДНК (так как повреждение главной матрицы во многих случаях не может быть “отремонтировано”), которые в дальнейшем, через цепь различных событий, ведут к увеличению вероятности смерти организма, т.е. к старению. Чем выше скорость пролиферации клеток, тем легче они должны избегать накопления на уровне всей клеточной популяции указанных повреждений из-за простого их “разбавления”. “Бес-

смертной” гидре за счет непрерывного обновления всех клеток удается сохранять в определенных условиях свою жизнеспособность на неизменном уровне в течение практически неограниченного времени [14].

Таким образом, у ограничения клеточной пролиферации действительно есть определенная ЦЕЛЬ, выражающаяся в формировании тканей и органов высших организмов (включая человека), однако она, на наш взгляд, не является “геронтологической” и не свидетельствует о ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ процесса старения.

Судя по всему, программы старения вообще не существует, а оно является лишь некоторым “побочным продуктом” программы развития [4–5, 7–8], реализация которой у высших организмов с необходимостью предполагает появление популяций клеток с очень низкой и даже нулевой пролиферативной активностью.

Как уже отмечалось ранее [5], программой в биологическом смысле является некоторый набор команд, “выдача” которых в организме не происходит в ответ на некоторое внешнее воздействие, а определяется только временной шкалой. В этом смысле апоптоз можно считать запрограммированным явлением лишь применительно к эмбриональному развитию, когда его отсутствие просто сделает невозможным появление нормального новорожденного организма.

Различия в продолжительности жизни (включая видоспецифические), на наш взгляд, определяются лишь различиями в программах, определяющих не скорость старения, а формирующуюся в процессе развития НАДЕЖНОСТЬ различных систем (клетки, органы, ткани) конкретного организма. Именно высокая надежность большинства систем нашего организма является ЦЕЛЕСООБРАЗНОЙ с позиций обеспечения долголетия человека.

Впрочем, природа, по-видимому, не всегда заинтересована в “супернадежности” абсолютно всех тканей многоклеточного организма. Скажем, при 100%-ной устойчивости половых клеток (как мужских, так и женских) к мутациям процесс эволюции мог бы очень сильно замедлиться. Интересно, кстати, отметить, что ооциты у большинства видов млекопитающих фактически представляют собой аналог стационарной клеточной культуры, полностью состоящей из неделящихся клеток. У новорожденной девочки имеется лишь ограниченный запас половых клеток (300–400 тысяч), находящихся в дикийтотене мейоза и успешно претерпевающих “стационарное старение”. Никаких новых ооцитов впоследствии не возникает.

В то же время, “побочным продуктом” низкой надежности женских половых клеток является так называемый “эффект возраста матери”, выражающийся в резком увеличении с возрастом вероятности появления аномального потомства у женщин старше 35 лет. Тот факт, что дети все-таки рождаются молодыми, определяется наличием целого ряда специальных барьеров [15], предотвращающих, как

правило, появление потомства из ооцитов со “старческими” дефектами. Видимо, в этом случае природа сочла ЦЕЛЕСООБРАЗНЫМ отбор неповрежденных ооцитов для их последующего оплодотворения [15]. Ситуация в некотором роде сходна с той, которую мы наблюдаем у пресноводной гидры, непрерывно сбрасывающей поврежденные клетки вместо того, чтобы их “ремонттировать” [14].

Конечно, в природе существует много примеров такого явления, как запрограммированная смерть. Однако в данном случае речь идет именно о запрограммированной ГИБЕЛИ организма, но не о его запрограммированном СТАРЕНИИ, т.е. запрограммированном увеличении с возрастом вероятности смерти. Такой способ элиминации уже не нужных особей представляется нам слишком громоздким и НЕЦЕЛЕСООБРАЗНЫМ, чтобы именно им воспользовалась эволюция для обеспечения благополучия вида в целом.

Известно, что у человека старение (т.е. увеличение вероятности смерти) начинается лет в 15. Но это — у человека, существа социального и потому защищенного от неблагоприятного воздействия внешней среды достижениями цивилизации. В дикой же природе старение, как правило (нужно подчеркнуть — как правило, так как есть и исключения типа уже упомянутых слонов и высших приматов, а также некоторых крупных животных вроде китов), не наблюдается, ибо практически все особи погибают задолго до начала этого процесса. Кроме того, как нам кажется, даже в тех случаях, когда эволюция “видит” старение до завершения репродуктивного периода, она старается ЗАМЕДЛИТЬ этот процесс и увеличить максимальную продолжительность жизни, увеличивая тем самым как длительность развития, так и период фертильности (собственно, именно это мы и наблюдаем на протяжении нескольких последних миллионов лет). По-видимому, ИЗОБРЕТЕНИЕ или УСКОРЕНИЕ старения (скажем, с помощью специальной программы) для эволюции либо невыгодно, либо просто лишено смысла.

В пользу отсутствия созданной эволюцией специальной программы старения может служить и следующий довод. В принципе, любую программу можно сломать. В частности, мы знаем много случаев нарушения программы развития, в результате чего либо погибает эмбрион, либо на свет появляется аномальное потомство. Однако нам не известны случаи нарушения соответствующей программы (если она существует) у отдельных особей стареющих видов, в результате чего они становились бы “бессмертными”.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что если бы программа старения все-таки существовала, ее отмена, к которой призывают геронтологи-“программисты”, не обязательно должна была бы приводить к изменению возрастной динамики тех биомаркеров старения (БС), которые непосредственно связаны с пролиферативным статусом клеток, образующих органы и ткани организма

[16]. По крайней мере, это должно касаться тех БС, которые не вовлечены в механизмы увеличения вероятности смерти с возрастом. Если же какие-то БС являются “сущностными” [15], т.е. без влияния на них нельзя замедлить процесс старения, то постулируемый механизм отмены программы старения должен позволить объяснить, каким образом такие БС будут постоянно удаляться из постмитотических или очень медленно размножающихся клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev V.P. Phenoptosis: programmed death of an organism // *Biochemistry (Mosc.)*. 1999. Vol. 64. N 12. P. 1418–1426.
2. Bredesen D.E. The non-existent aging program: how does it work? // *Aging Cell*. 2004. Vol. 3. N 5. P. 255–259.
3. Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V.P. Programmed and altruistic ageing // *Nat. Rev. Genet.* 2005. Vol. 6. N 11. P. 866–872.
4. Holliday R. Aging: The paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.
5. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
6. Kirkwood T.B.L., Melov S. On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history // *Curr. Biol.* 2011. Vol. 21. N 18. P. R701–R707.
7. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? // *Biogerontology*. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
8. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
9. Weismann A. Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena: G. Fischer Verlag, 1885. 112 p.
10. Kirkwood T.B., Cremer T. Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress // *Hum. Genet.* 1982. Vol. 60. N 2. P. 101–121.
11. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // *Biophysics*. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
12. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
13. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.
14. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
15. Khokhlov A.N. Cytogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // *Russ. J. Dev. Biol.* 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
16. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
17. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992. Vol. 663. P. 475–476.
18. Khokhlov A.N. Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
19. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.

Поступила в редакцию
12.07.2017

Принята в печать
01.09.2017

GERONTOLOGY

DOES AGING HAVE A PURPOSE?

A.N. Khokhlov, A.A. Klebanov, G.V. Morgunova*

*Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

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

Ideas of proponents and opponents of the programmed aging concerning the feasibility of this phenomenon for the evolution of living organisms are shortly considered. We think that evolution has no “gerontological” purpose, because the obligate restriction of cell proliferation during the development of multicellular organisms is a factor that “automatically” launches aging due to the accumulation in the cells of various macromolecular lesions because of inhibition or even complete cessation of the appearance of new, intact cells. This leads to suppression of “dilu-

tion” of stochastic damage (the most important of which are DNA lesions) at the level of the entire cellular population. Some additional arguments are also listed in favor of the inexpediency of aging for both species and individual.

Keywords: *aging, evolution, natural selection, life span, development, cell proliferation*

Сведения об авторах

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90;

e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Клебанов Александр Александрович — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru

Моргунова Галина Васильевна — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.526.325.2

ОБНАРУЖЕНИЕ МИКРОЦИСТИНОВ В ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБРАСТАНИЯХ РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ**О.И. Белых*, Г.А. Фёдорова, А.В. Кузьмин,
И.В. Тихонова, О.А. Тимошкин, Е.Г. Сороковикова***Лимнологический институт СО РАН, Россия,
664033, г. Иркутск, Улан-Баторская, д. 3***e-mail: belykh@lin.irk.ru*

Некоторые виды цианобактерий способны продуцировать токсины, концентрация которых в период цветения воды может достигать величины, опасной для жизни человека и животных. Планктонные цианобактерии являются наиболее распространенными и изученными продуцентами микроцистинов — циклических гептапептидов, вызывающих поражения печени, менее известны микроцистин-синтезирующие бентосные цианобактерии. В озере Байкал в последние годы зарегистрировано массовое развитие бентосных цианобактерий, формирующих обширные обрастания на различных субстратах. В обрастаниях природных и искусственных субстратов, отобранных в прибрежной зоне озера Байкал, в том числе на больных и погибших эндемичных губках *Lubomirskia baicalensis* и *Baikalospongia* spp., выявлены микроцистины, продуцируемые бентосными цианобактериями. С применением микроскопии показано, что в составе обрастаний преобладают ностокковые и осцилляториевые цианобактерии с доминированием *Tolypothrix distorta* — потенциального продуцента микроцистинов. Концентрация микроцистинов в биопленках по данным иммуноферментного анализа составила 29,8–3050 мкг/кг сухого веса. Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF идентифицировано восемь вариантов микроцистинов, из которых наиболее часто встречался вариант [Dha⁷]MC-YR. В биопленках, образованных на искусственном субстрате видом *Phormidium autumnale*, также выявлено присутствие микроцистинов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости регулярного мониторинга потенциально токсичных видов и содержания цианотоксинов в планктоне и бентосе прибрежной зоны озера Байкал, особенно в районах активной туристско-рекреационной деятельности.

Ключевые слова: озеро Байкал, цианобактерии, *Tolypothrix distorta*, микроцистины, губки, MALDI-TOF/TOF, иммуноферментный анализ

Цианобактерии (сине-зеленые водоросли) являются постоянным компонентом пресноводных и морских экосистем, они обитают в толще воды, на дне водоемов, на поверхности водных растений и других объектов. В условиях повышенной температуры и освещенности, при избытке биогенов, в отсутствие интенсивного перемешивания цианобактерии в водоемах начинают быстро развиваться, приводя к цветению воды [1–4]. Примерно в 60% случаев цветение вызвано токсичными видами цианобактерий, представляющими серьезную угрозу для здоровья человека и животных [1].

Наиболее распространенными цианотоксинами пресных вод являются микроцистины (microcystins, MC) — циклические пептиды, состоящие из семи аминокислотных остатков. В настоящее время выявлено около 90 вариантов MC, среди них наиболее часто встречаются MC-LR, MC-RR и MC-YR [1, 2]. MC — химически стабильные соединения, они сохраняют свои токсические свойства в воде в течение нескольких недель, устойчивы к нагре-

ванию и расщеплению пищеварительными ферментами. MC обладают выраженным гепатотоксичным действием: ингибируя активность серин-треониновых фосфатаз в печени, вызывают разрушение цитоскелета гепатоцитов [1, 2]. При отравлении MC в высокой концентрации наблюдаются клинические признаки острой интоксикации, в тяжелых случаях — обширные кровоизлияния в печени. Длительное воздействие MC в низких дозах приводит к образованию опухолей. Согласно рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) концентрация MC-LR в питьевой воде не должна превышать 1 мкг/л, а в воде для купания и рекреационного использования — 2–4 мкг/л [1].

Долгое время продуцентами MC считались планктонные цианобактерии, однако в последние годы при исследовании случаев гибели животных нередко их источником оказываются бентосные виды [3]. Первое сообщение об отравлении животных MC из цианобактериальных матов альпийских озер, приведшее к гибели более сотни особей круп-

ного рогатого скота, зарегистрировано в 1994–1995 гг. в Швейцарии [5]. В течение ряда лет в Африке, Северной Америке, Европе, Австралии, Новой Зеландии отмечались множественные отравления диких и домашних птиц в период массового развития бентосных цианобактерий [3].

Для многих водных животных установлена токсичность МС [2]. Известно, что причиной болезни и гибели кораллов вследствие некроза тканей могут быть нитчатые МС-продуцирующие цианобактерии в комплексе с гетеротрофными бактериями [6]. Во время летальных заболеваний морских губок в их телах обнаруживали большое количество нитчатых цианобактерий, однако сведений о присутствии цианотоксинов в них нет [7].

В озере Байкал с 2011 г. наблюдаются крупномасштабные изменения в литоральной зоне, среди которых особое место занимает массовая гибель губок, сопровождаемая интенсивным развитием нитчатых цианобактерий на их поверхности [8]. Доля пораженных эндемичных губок *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), которые до описываемых событий покрывали около 47% поверхности дна озера, составляет от 30% до 100% в отдельных районах озера. “Экологический кризис” на Байкале – крупнейшем озере мира и объекте всемирного природного наследия ЮНЕСКО, содержащем более 80% пресных вод России и около 20% мировых запасов, привлек внимание многих исследователей, однако причины происходящих перемен остаются неизвестными до настоящего времени [8, 9].

Цель настоящей работы – изучить видовой состав цианобактерий в обрастаниях различных субстратов литоральной зоны озера Байкал, определить концентрацию МС с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и идентифицировать их структурные варианты методом масс-спектрометрии.

Материалы и методы

Пробы отобраны в мае, июле и сентябре 2015 г. в прибрежной зоне Южного Байкала у поселков Листвянка и Большие Коты водолазами-исследователями с глубин 3–15 м. Взяты 14 проб с различных субстратов: № 11, 16–19, 23 – с *Lubomirskia baicalensis*, № 13, 22 – с *Baikalospongia* sp.; № 12, 14, 15, 24 – с камней, № 21 – со скального участка, № 25 – с подводной части деревянного пирса (таблица). Одна проба воды отобрана шприцем у поверхности губки № 11. Обрастания с больных и мертвых губок отбирали вместе с кусочками тел животных. Для микроскопического изучения пробы были зафиксированы 4%-ным формалином, для генетического исследования, ИФА и масс-спектрометрического анализа образцы замораживали.

Видовую идентификацию цианобактерий проводили, используя световой микроскоп Axio Imager (Zeiss, Германия), снабженный ртутной лампой НВО 100W и камерой AxioCam, согласно определителям

[10–12]. Частоту встречаемости видов определяли по шкале Старха.

ИФА проводили с помощью набора Abraxis Microcystins-ADDA ELISA (Abraxis LLC, США) согласно протоколу производителя. Результаты обрабатывали с использованием программы RIDA®SOFT Win. Анализ включал два этапа: первый – скрининг проб непосредственно на борту научно-исследовательского судна на наличие МС; второй – определение концентрации МС в лаборатории (предварительно образцы высушивали при температуре +60°C и взвешивали).

Для масс-спектрометрического определения МС сухую биомассу обрастаний дважды экстрагировали 75%-ным метанолом в течение 60 мин при воздействии ультразвука. Полученные экстракты объединяли и упаривали досуха на ротаторном испарителе при температуре водяной бани $45 \pm 2^\circ\text{C}$ и снова растворяли в метаноле [13]. Идентификацию МС выполняли на tandemном времяпролетном масс-спектрометре с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF) (Bruker Daltonics, Германия), используя в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов (рабочая длина волны лазера 355 нм). Диапазон регистрируемых масс 500–3500 Да.

Результаты и обсуждение

Визуальное наблюдение. При внешнем осмотре фрагментов трех ветвистых губок *L. baicalensis*, отобранных с глубин 10–15 м, наблюдали ветви с деструктивными изменениями, лишенные характерной зеленой окраски и покрытые сине-зелеными или буро-фиолетовыми кустистыми обрастаниями и коричневыми пленками. При этом у двух губок (№ 11 и 16) выявили очаги поражения красно-коричневого цвета, у одной губки (№ 23) отмечали обширные участки обесцвечивания. Три экземпляра *L. baicalensis* (№ 17–19), отобранные с глубин 3–7 м, отличались разрушенными буро-зелеными ветвями и обрастаниями бурого и темно-зеленого цвета. Две корковые губки *Baikalospongia* sp. со значительными разрушениями тела были, очевидно, погибшими: образец № 13 характеризовался буро-коричневой окраской тела, красно-коричневыми очагами некроза и сходного цвета обрастаниями; образец № 22 был полностью обесцвечен, поверхность покрыта розовым налетом. Пробы с камней и со скалы представлены кустистыми обрастаниями от буро-зеленого до красно-коричневого цвета; образец, взятый с камня (проба № 24), состоял из полушаровидных сине-зеленых колоний; соскоб с поверхности пирса имел вид кожистых пленок темно-зеленого цвета.

Видовой состав цианобактерий. Микроскопическое наблюдение показало, что во всех пробах основную биомассу обрастаний составляют цианобактерии. В биопленках выявлено 23 вида цианобактерий, относящихся к порядкам Synechococcales,

Таблица

Видовой состав бентосных цианобактерий в озере Байкал в 2015 г. и относительное обилие видов по шкале Стармаха («—» — отсутствует; «+» — очень редко; 1 — 1–6 экземпляров в препарате; 2 — 7–16 экземпляров; 3 — 17–30 экземпляров; 4 — 31–50 экземпляров; 5 — абсолютное преобладание, более 50 экземпляров)

Порядок. Вид	Станции отбора проб	Пос. Листвянка (51°51.58' N, 104°51.84' E)									Пос. Большие Коты (51°54.29' N, 105°4.47' E)				
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	23	24	25
Synechococcales															
<i>Chamaesiphon fuscus</i> (Rostafinski) Hansgirg	2	2	–	–	–	–	–	–	2	–	–	5	–	–	
<i>Heteroleibleinia kuetzingii</i> (Schmidle) Compère	2	1	–	–	–	–	–	–	2	–	–	4	–	–	
<i>Leibleinia epiphytica</i> (Hieronymus) Compère	2	2	1	3	3	1	1	–	–	2	–	2	–	–	
<i>Leptolyngbya</i> sp.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	+	
<i>L. margaritata</i> (Kufferath) Anagnostidis	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher	3	–	4	4	3	2	–	–	–	3	–	–	–	–	
<i>P. mucicola</i> (Naumann et Huber-Pestalozzi) Schwabe	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Synechococcus/Cyanobium</i> spp.	4	4	4	4	4	5	–	–	–	–	5	5	–	–	
Chroococcales															
<i>Aphanocapsa parasitica</i> (Kützing) Komárek et Anagnostidis	1	1	2	3	3	2	1	–	5	+	–	+	–	–	
<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
<i>C. minor</i> (Kützing) Nägeli	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	
<i>M. wesenbergii</i> (Komárek) Komárek ex Komárek	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	
Oscillatoriales															
<i>Kamptonema formosum</i> (Bory ex Gomont) Strunecký, Komárek et J.Smarda	5	2	3	2	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Microcoleus paludosus</i> Gomont	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Oscillatoria curviceps</i> C.Agardh ex Gomont	1	1	–	1	1	5	–	–	–	1	–	–	–	–	
<i>Phormidium autumnale</i> Gomont	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5	
<i>Symplocastrum</i> sp.	–	–	–	5	5	1	–	–	–	5	–	2	–	–	
<i>Tychonema</i> sp.	3	3	2	2	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	
Nostocales															
<i>Rivularia borealis</i> P. Richter	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Tolypothrix distorta</i> Kützing ex Bornet et Flahault	5	5	5	+	2	5	5	5	5	5	–	5	5	–	
<i>Calothrix</i> sp.	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	
Всего видов	13	10	8	9	9	9	3	2	5	8	1	10	1	2	

Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales (таблица). Из восьми наиболее часто встречающихся видов цианобактерий пять представлены нитчатыми формами. Обесцвеченная *Baikalospongia* sp. единственная не содержала нитчатых цианобактерий, в розовом налете и поверхностном слое ее тела в массе обнаружены клетки, соответствующие морфотипам родов *Synechococcus* C. Nägeli и *Cyanobium* R. Rippka et G. Cohen-Bazire. По морфологическим признакам виды этих родов весьма сходны и их часто объединяют в совместный кластер пикопланктонных цианобактерий. Пикоцианобактерии, в большом количестве развиваясь в планктоне Байкала (до 3 млн клеток/мл), попадают в тело губки с током воды при фильтрации и составляют значительную часть микробиомов здоровых губок [14]. Вероятно, некоторые представители родов *Synechococcus* и *Cyanobium* также являются симбионтами байкальских губок. У морских губок обнаружен внутриклеточный *Synechococcus spongiarum* Usher, Toze, Fromont, Kuo & Sutton [7], однако близкородственных ему филотипов у байкальских представителей не найдено [14]. К настоящему времени достоверных сведений о продукции токсинов цианобактериями родов *Synechococcus* и *Cyanobium* нет.

Среди порядка Synechococcales к многочисленным в биопленках видам также можно отнести *Chamaesiphon fuscus* и *Leptolyngbya margaritata*. *Ch. fuscus*, как правило, встречался на спикулах в некротизированных участках тела губок, а *L. margaritata* формировала коричневые пленки на поверхности *L. baicalensis*.

Из представителей порядка Chroococcales в большинстве биопленок выявлена *Aphanocapsa parasitica*. Известные продуценты МС — планктонные хроококковые *Microcystis aeruginosa* и *M. wesenbergii* — отмечены в малом количестве и только в двух пробах.

В 72% образцов преобладал *Tolypothrix distorta*, порядок Nostocales (рис. 1, А). Его трихомы синезеленого и красно-коричневого цвета, частью уже отмершие, встречались во всех обрастаниях, кроме обесцвеченной губки и биопленки с пирса. Обрастания, покрывающие камень (проба № 24), представляли собой многочисленные колонии *T. distorta*. Согласно многолетним наблюдениям, *T. distorta* ранее встречался вдоль всего побережья Байкала на камнях и макрофитах преимущественно на глубинах от 1,5 до 6 м, его биомасса в среднем достигала 0,25 г/м² [15]. С 2015 г. вид стали отмечать на глубинах 0–1,5 м, в первом растительном поясе, при этом биомасса *T. distorta* увеличилась в сотни раз [8]. В этот период *T. distorta* впервые найден на губках, причины колонизации видом губок и его роль в болезни и последующей гибели эндемичных животных не установлены [9]. На основе данных генетического анализа и масс-спектрометрии высказано предположение о способности *T. distorta* продуцировать паралитические токсины моллюсков, включая самый токсичный вариант — сакситоксин

[9]. Другие виды ностоковых присутствовали на камнях и губках очень редко. Следует отметить, что ранее нитчатые цианобактерии на губках не обнаруживали даже при изучении их метаболомных сообществ [14].

Многочисленным видом в исследованных образцах являлся представитель осцилляториевых — *Symplocastrum* sp. (рис. 1, Б). Его кустистые дерновинки с трихомами буро-коричневого цвета в большом количестве обнаружены на твердых субстратах и, изредка, на ветвистых губках. Другие часто встречающиеся осцилляториевые цианобактерии — *Kamptonema formosum* и *Tychonema* sp. — образовывали красно-коричневые пленки в очагах некроза на поверхности губок (рис. 1, В). Присутствие *Oscillatoria curviceps* зарегистрировано в шести пробах. *Phormidium autumnale* преобладал в биопленках, сформированных на подводной части пирса.

Изучение видового состава цианобактериальных обрастаний озера Байкал показало присутствие видов, известных в других водоемах в качестве продуцентов МС. Прежде всего, это виды *Pseudanabaena mucicola*, *P. galeata*, *K. formosum*; их токсичность установлена методами химического анализа и биотестирования на животных, а в одном случае подтверждена наличием генов, кодирующих синтез МС [2, 16, 17]. Достоверно определена продукция МС в колониях *T. distorta*, отобранных из бен-

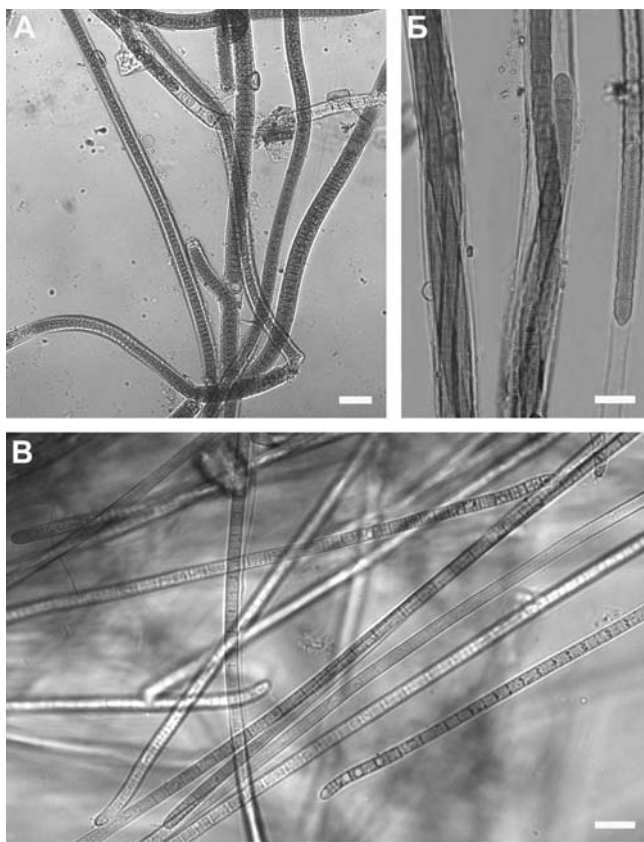


Рисунок 1. Цианобактерии из обрастаний различных субстратов. А — *Tolypothrix distorta*, Б — *Symplocastrum* sp., В — *Tychonema* sp. Масштабная линейка 20 мкм

тосных сообществ реки Аларабэ, Испания [18]. Анализируя родовой состав бентосных цианобактерий озера Байкал, можно отметить, что в других водоемах среди родов *Leptolyngbya* *Anagnostidis* et *Komárek* и *Rivularia* С. Agardh ex Bornet et Flahault найдены МС-продуцирующие виды [3, 16].

Иммуноферментный и масс-спектрометрический анализ. Методом ИФА МС выявлены во всех исследованных образцах: в 14 пробах обрастаний (рис. 2) и в воде, взятой в непосредственной близости от ветвистой губки (№ 11). В воде концентрация МС составила 0,1 мкг/л, что в десять раз ниже нормативов ВОЗ для питьевой воды. В биопленках концентрация МС варьировала от 29,8 до 3050 мкг/кг сухого веса. Наибольшее содержание МС выявлено в обрастаниях губок и колониях *T. distorta*. Минимальная концентрация МС отмечена в биопленке, образованной *P. autumnale*: в этой пробе детектировано четыре варианта МС, три из которых в других образцах не обнаружены. Всего в биопленках озера Байкал методом MALDI-TOF идентифицировано восемь вариантов МС (рис. 2). Профили токсинов в исследованных пробах в основном сходны, самым частым вариантом был деметилированный вариант МС-YR – [Dha⁷]МС-YR (замена остатка аминокислоты N-метилдегидроаланин на дегидроаланин), обнаруженный в обрастаниях губок (№ 11, 13) и камней (№ 12, 14), а также в колониях *T. distorta* (№ 24) и пленках из *P. autumnale* (№ 25).

Таким образом, в обрастаниях, развивающихся на различных субстратах в озере Байкал, присутствуют МС-продуцирующие цианобактерии. Принимая во внимание, что практически во всех пробах

наблюдалось абсолютное преобладание *T. distorta*, способного синтезировать МС, скорее всего этот вид и является продуцентом данных токсинов в озере Байкал.

Среди байкальских цианобактерий имеются виды, производящие другие группы токсинов. Для *K. formosum*, *Tychonema bourellyi*, *P. autumnale* показан синтез анатоксинов – нейротоксичных алкалоидов [2, 3, 19, 20]. *P. autumnale* известен как один из самых распространенных продуцентов анатоксинов, в Новой Зеландии он стал причиной многочисленных отравлений и гибели собак [20]. При этом авторы не выявили синтез МС у *P. autumnale*.

Возможная находка в озере Байкал МС-продуцирующего *P. autumnale*, как и *T. distorta*, требует дальнейших исследований, в первую очередь для того, чтобы определить потенциальный риск для человека и животных.

Концентрация МС в биопленках озера Байкал значительно ниже, чем в планктоне цветущих водоемов [1, 2], но сопоставима с таковой в цианобактериальных матах водоемов Антарктиды и Арктики [21–23]. В бентосных пробах самое высокое содержание МС определено в реке Нил (до $4,1 \cdot 10^6$ мкг/кг сухого веса) [3]. В данной работе было затруднительно оценить реальную угрозу развития токсичных цианобактерий в озере Байкал в связи с отсутствием единых, утвержденных ВОЗ, нормативов для бентосных МС-продуцирующих цианобактерий. В странах, где проводится мониторинг численности потенциально токсичных видов и цианотоксинов, используются региональные нормативы для МС [3]. Вместе с тем, несмотря на низкое содержание МС в обрастаниях и воде

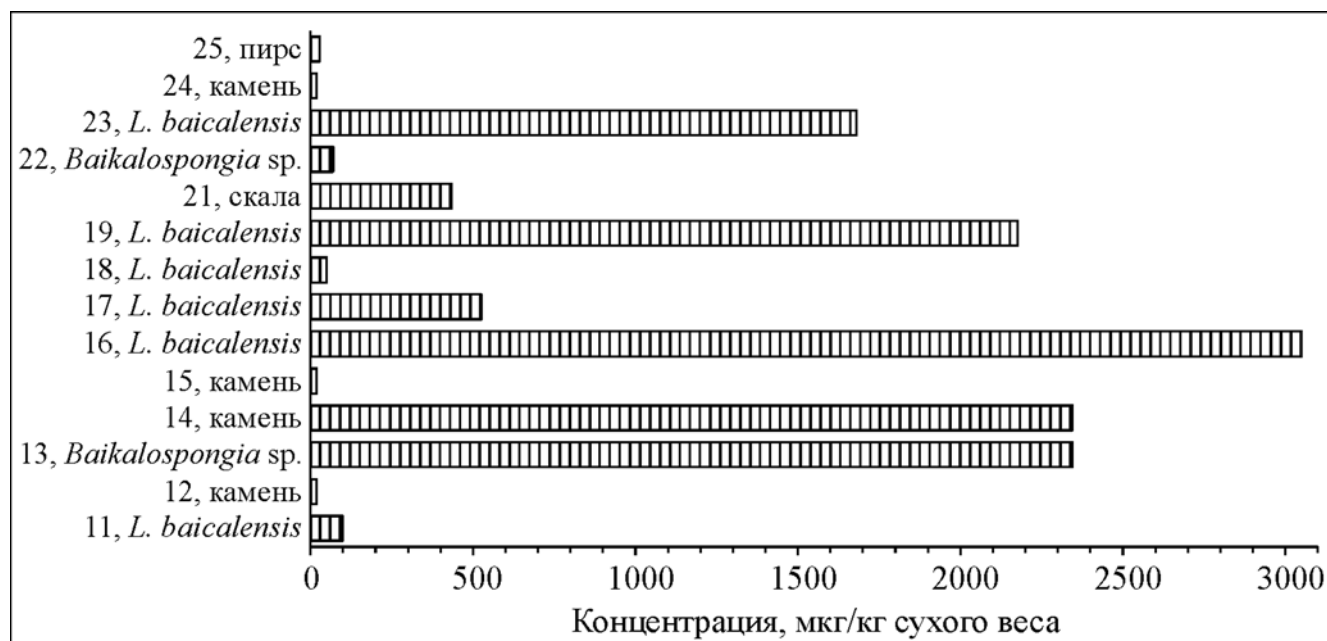


Рисунок 2. Концентрация МС в цианобактериальных обрастаниях различных субстратов в озере Байкал. Варианты МС в пробах: 11 – МС-YR, [Dha⁷]МС-YR; 12 – [Dha⁷]МС-YR; 13 – МС-LA, [Dha⁷]МС-YR; 14 – [Dha⁷]МС-YR; 17 – МС-LF; 18 – [L-MeSer⁷]МС-LR; 19 – МС-YR; 24 – [Dha⁷]МС-YR; 25 – [D-Asp³,Dha⁷]МС-HtyR, МС-RR, МС-HtyR, [Dha⁷]МС-YR; 15, 16, 21–23 – не идентифицированы

озера Байкал, потенциальная опасность отравления в результате употребления питьевой воды все же существует.

Цианобактериальные сообщества озера Байкал, сходные по видовому составу и содержанию МС с матами полярных регионов, характеризуются уникальным профилем МС. В альгобактериальных матах водоемов Арктики и Антарктики идентифицированы, в основном, варианты МС-RR и МС-LR, продуцентом которых являлся *Nostoc* sp., хотя в арктических пробах в массе встречался и *T. distorta* [21–23]. Варианты МС в Байкале, синтезируемые, вероятно, преобладающим видом *T. distorta*, отличаются от таковых у *T. distorta* из реки в Испании, производящего пять вариантов с доминированием МС-YR [18]. В байкальских пробах превалировал деметилированный вариант [Dha⁷]МС-YR, МС-YR найден только в двух образцах, в которых его концентрация достигала 2178 мкг/кг сухого веса, что сопоставимо с содержанием МС у *T. distorta* из субтропических широт [18]. Количество и состав МС значительно варьируют не только между видами, но и между штаммами одного вида и зависят в первую очередь от абиотических факторов среды [1, 2]. Большое число вариантов МС, около 20, характерно для штаммов *Microcystis aeruginosa*, у бентосных цианобактерий такого разнообразия МС не описано [1–3].

Массовое развитие планктонных токсичных цианобактерий является следствием глобальных процессов изменения климата и эвтрофирования водоемов, как установлено многими исследованиями [1–4]. Вместе с тем, причины увеличения частоты и распространенности цветений воды цианобактериями, как и факторы, влияющие на синтез циатоксинов, до конца не ясны. Нередко бентосные цианобактерии могут создавать высокую биомассу в малопродуктивных водоемах, например, в озерах и реках Швейцарии и Новой Зеландии [3, 5, 20]. Подобное явление наблюдается в последние годы на Байкале, цианобактерии в большом количестве развиваются в озере, достигая значений биомассы характерных для эвтрофных водоемов, однако в настоящий период трофический статус озера соответствует олиготрофному по гидрохимическим показателям [24]. С другой стороны, первые признаки эвтрофирования, выраженные в изменении видового состава водорослей и росте биомассы фитопланктона, отмечали в мелководных участках Байкала еще в 70-е гг. XX века [25]. В 80-е гг. в заливах

впервые зарегистрировано цветение воды, вызванное *Anabaena lemmermannii* P.G. Richter. В 2011–2016 гг. на многих участках прибрежной зоны обнаружено появление несвойственных озеру нитчатых водорослей рода *Spirogyra* Link и найдена высокая концентрация термотолерантных колиформных бактерий – показателей антропогенного загрязнения [8]. Ранее мы сообщали о высокой численности цианобактерий и присутствии токсичных видов в планктоне литорали, отмечая возросшую опасность развития токсичных цветений [9, 13]. Очевидно, биота озера (в большей степени – первичные продуценты) является наиболее чутким индикатором эвтрофирования, которое, в первую очередь начинается в прибрежных участках озера.

Исследователи арктических и антарктических альгобактериальных матов определяют температуру как основной фактор, влияющий на видовой состав цианобактерий и продукцию МС: экспериментально доказано, что с повышением температуры концентрация МС многократно возрастает [22, 23]. Продолжающееся изменение климата, по мнению многих авторов, может привести к увеличению продукции токсинов и появлению токсичных штаммов [1, 22, 23]. На озере Байкал с 1896 г. годовая температура воздуха поднималась со средней скоростью 1,2°C/100 лет. За последние 60 лет постепенно возрастает температура верхних слоев воды в теплое время года [24].

Наличие МС в обрастаниях различных подводных субстратов, включая эндемичные губки и искусственные объекты, свидетельствует о масштабном распространении токсичных цианобактерий в литоральной зоне озера Байкал и потенциальной угрозе для человека и животных. В условиях изменения климата и повышения антропогенного воздействия на экосистему озера, особенно в рекреационных зонах, необходимо проводить регулярный мониторинг токсичных цветений на озере Байкал. Учитывая цитотоксическое действие МС на многих гидробионтов, роль МС в возникновении и развитии болезни эндемичных байкальских губок требует отдельного изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-54-44035), в рамках государственных заданий № 0345-2016-0003 и № 0345-2016-0009 с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Ультрамикроанализ” Лимнологического института.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management / Eds. I. Chorus and J. Bartram. WHO. London: Chapman & Hall, 1999. 416 p.
2. Chorus I. Cyanotoxins – occurrence, causes, consequences. Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag, 2001. 357 p.
3. Quiblier C., Wood S., Echenique-Subiabre I., Heath M., Villeneuve A., Humbert J.-F. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – ecology, toxin

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2017. Т. 72. № 4

production and risk management // Water Res. 2013. Vol. 47. N 15. P. 5464–5479.

4. Paerl H.W., Otten T.G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls // Microb. Ecol. 2013. Vol. 65. N 4. P. 995–1010.
5. Mez K., Beattie K.A., Codd G.A., Hanselmann K., Hauser B., Naegeli H., Preisig H.R. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on al-

- pine pastures in Switzerland // *Eur. J. Phycol.* 1997. Vol. 32. N 2. P. 111–117.
6. Richardson L.L., Miller A.W., Broderick E., Kaczmar-sky L., Gantar M., Stanic D., Sekar R. Sulfide, microcystin, and the etiology of black band disease // *Dis. Aquat. Organ.* 2009. Vol. 87. N 1–2. P. 79–90.
 7. Webster N.S., Thomas T. The sponge hologenome // *MBio.* 2016. Vol. 7. N 2. e00135-16.
 8. Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // *J. Great Lakes Res.* 2016. Vol. 42. N 3. P. 487–497.
 9. Belykh O.I., Tikhonova I.V., Kuzmin A.V., Sorokovi-kova E.G., Fedorova G.A., Khanaev I.V., Sherbakova T.A., Timoshkin O.A. First detection of benthic cyanobacteria in Lake Baikal producing paralytic shellfish toxins // *Toxicon.* 2016. Vol. 121. P. 36–40.
 10. Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota – 1. Teil: Chroococcales // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/1 / Eds. H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig, and D. Mol-lenhauer. Gustav Fischer Verlag, 1999. 548 p.
 11. Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota – 2. Teil: Oscillatoriales // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Band 19/2 / Eds. B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner, and M. Schagerl. Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. 759 p.
 12. Komárek J. Cyanoprokaryota – 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19/3 / Eds. B. Büdel, G. Gärtner, and L. Krienitz. Springer Spektrum, 2013. 1131 p.
 13. Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G., Ti-khonova I.V., Potapov S.A., Fedorova G.A. Microcystin-pro- ducing cyanobacteria in water reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine // *Chem. Sustain. Dev.* 2013. Vol. 21. N 4. P. 347–361.
 14. Gladkikh A.S., Kalyuzhnaya O.V., Belykh O.I., Ahn T.S., Parfenova V.V. Analysis of bacterial communities of two Lake Baikal endemic sponge species // *Microbiology.* 2014. Vol. 83. N 6. P. 787–797.
 15. Ижболдина Л.А. Атлас и определитель водорос- лей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо-и макро- фиты) с краткими очерками по их экологии. Новоси- бирск: Наука, 2007. 248 с.
 16. Pineda-Mendoza R.M., Olvera-Ramírez R., Mar- tínez-Jerónimo F. Microcystins produced by filamentous cy- anobacteria in urban lakes. A case study in Mexico City // *Hidrobiológica.* 2012. Vol. 22. N 3. P. 290–298.
 17. Teneva I., Mladenov R., Dzhambov B. Toxic ef- fects of extracts from *Pseudanabaena galeata* (Cyanopro- karyota) in mice and cell cultures *in vitro* // *Nat. Sci. Hum.* 2009. Vol. 12. P. 237–243.
 18. Aboal M., Puig M.Á., Asencio A.D. Production of microcystins in calcareous Mediterranean streams: The Al- harabe River, Segura River basin in south-east Spain // *J. Appl. Phycol.* 2005. Vol. 17. N 3. P. 231–243.
 19. Shams S., Capelli C., Cerasino L., Ballot A., Dietrich D.R., Sivonen K., Salmaso N. Anatoxin-a producing *Tychonema* (Cyanobacteria) in European waterbodies // *Water Res.* 2015. Vol. 69. P. 68–79.
 20. McAllister T.G., Wood S.A., Hawes I. The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity // *Harmful Algae.* 2016. Vol. 55. P. 282–294.
 21. Wood S.A., Mountfort D., Selwood A.I., Holland P.T., Puddick J., Cary S.C. Widespread distribution and identifica- tion of eight novel microcystins in Antarctic cyanobacterial mats // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74. N 23. P. 7243–7251.
 22. Kleinteich J., Wood S.A., Puddick J., Schleheck D., Kupper F.C., Dietrich D. Potent toxins in Arctic environ- ments – presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems // *Chem. Biol. Interact.* 2013. Vol. 206. N 2. P. 423–431.
 23. Kleinteich J., Wood S.A., Kupper F.C., Camacho A., Quesada A., Frickey T., Dietrich D.R. Temperature-related changes in polar cyanobacterial mat diversity and toxin pro- duction // *Nature Clim. Change.* 2012. Vol. 2. P. 356–360.
 24. Shimaraev M.N., Domysheva V.M. Trends in hydro- logical and hydrochemical processes in Lake Baikal under conditions of modern climate change // *Climatic change and global warming of inland waters* / Eds. C. Goldman., M. Kumagai, and R. Robarts. NY: Wiley-Blackwell, 2013. P. 43–66.
 25. Popovskaya G.I. Ecological monitoring of phyto- plankton in Lake Baikal // *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 2000. Vol. 3. N 2. P. 215–225.

Поступила в редакцию
03.06.2017

Принята к печати
07.09.2017

ECOLOGY

MICROCYSTIN-PRODUCING CYANOBACTERIA IN BIOFILMS FROM THE LITTORAL ZONE OF LAKE BAIKAL

O.I. Belykh*, G.A. Fedorova, A.V. Kuzmin, I.V. Tikhonova, O.A. Timoshkin, E.G. Sorokovikova

*Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ulan-Batorskaya ul. 3, Irkutsk, 664033, Russia*

*e-mail: belykh@lin.irk.ru

Some species of cyanobacteria synthesize toxins, whose concentration during water bloom can reach values dangerous to human and animal health. Planktonic cyanobacteria are the most common and well-studied producers of microcystins – hepatotoxic cyclic heptapeptides, whereas microcystin-producing benthic cyanobacteria are less known. In recent years, the mass develop- ment of benthic cyanobacteria forming extensive fouling on different substrates has been recorded in the littoral zone of Lake Baikal. We found microcystins produced by benthic cyanobacteria in the biofouling inhabiting different substrates, including diseased and dead endemic sponges

Lubomirskia baicalensis and *Baikalospongia* spp., collected from the littoral area of Lake Baikal. Microscopic analysis of the biofouling revealed prevalence of Nostocales and Oscillatoriales cyanobacteria with the dominance of *Tolypothrix distorta* that is likely the main microcystin producer in Lake Baikal. According to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), microcystin concentrations in biofouling were 29.8–3050 µg/kg dry weight. We identified eight microcystin variants using MALDI-TOF/TOF; [Dha7]MC-YR being recorded in most samples. The presence of microcystins in biofilms formed on the surface of the artificial substrate by *Phormidium autumnale* was also recorded. The data obtained show the necessity to monitor potentially toxic species and concentrations of cyanotoxins in plankton and benthos in the littoral zone of Lake Baikal, especially in the regions with intense tourist and recreational activities.

Keywords: Lake Baikal, cyanobacteria, *Tolypothrix distorta*, microcystins, sponges, MALDI-TOF/TOF, ELISA

Сведения об авторах

Белых Ольга Ивановна — канд. биол. наук, доц., зав. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-425-415; e-mail: belykh@lin.irk.ru

Фёдорова Галина Афанасьевна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории хроматографии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-424-770; e-mail: fedorova@lin.irk.ru

Кузьмин Антон Васильевич — канд. хим. наук, науч. сотр. лаборатории хроматографии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-424-770; e-mail: kuzmin@lin.irk.ru

Тихонова Ирина Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-425-415; e-mail: iren@lin.irk.ru

Тимошкин Олег Анатольевич — докт. биол. наук, проф., зав. лаборатории биологии водных беспозвоночных Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-428-218; e-mail: tim@lin.irk.ru

Сорокикина Екатерина Георгиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-425-415; e-mail: katrin@lin.irk.ru

Указатель статей, опубликованных в журнале
“Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” в 2017 году

	№	Стр.
Биофизика		
Фурсова П.В., Воронова Е.Н., Левич А.П., Рисник Д.В., Погосян С.И. Отбор видов водорослей в состав лабораторного альгоценоза по их гидробиологическим и биофизическим характеристикам . . .	4	215
Ботаника		
Соколов Д.Д., Нуралиев М.С., Оскольский А.А., Ремизова М.В. Эволюция гинцея покрытосеменных растений: мономерия, псевдомономерия и миксомерия	3	115
Вирусология		
Кондакова О.А., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки	4	199
Трифорова Е.А., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Донченко Е.К., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Сравнительное изучение термической перестройки вирусов с икосаэдрическим и спиральным типом симметрии	4	209
Геронтология		
Забуга О.Г., Вайсерман А.М. Неполноценное питание в ранней жизни и риск развития диабета 2-го типа: теоретический базис и эпидемиологические доказательства	2	47
Моргунова Г.В., Клебанов А.А., Маротта Ф., Хохлов А.Н. рН культуральной среды и “стационарное”/хронологическое старение различных клеток	2	58
Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. Есть ли у старения цель?	4	258
Гидробиология		
Белевич Т.А., Ильяш Л.В., Милютин И.А., Логачева М.Д., Троицкий А.В. Обилие и видовой состав фотоавтотрофных пикозукариот Онежского залива Белого моря	3	128
Даллакян Г.А., Гершкович Д.М., Ипатов В.И., Исакова Е.Ф. Совместное действие тяжёлых металлов и шунгита на индикаторные планктонные организмы	3	135
Кудрявцева В.А., Белевич Т.А., Житина Л.С. Видовой состав диатомовых водорослей во льду пролива Великая Салма Белого моря перед весенним цветением	2	63
Клеточная биология		
Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеляк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до “органов-на-чипах”	4	187
Павлова Е.Р., Багров Д.В., Храмова Ю.В., Клинов Д.В., Шайтан К.В. Деформация ядер кератиноцитов НаСаТ на ориентированных волокнистых субстратах	2	99
Методы		
Валиева М.Е., Деркачева Н.И., Соколова О.С. Очистка ДНК-белковых комплексов с помощью нативного гель-электрофореза для исследования в электронном микроскопе	1	3
Котлярова М.С., Архипова А.Ю., Мойсенович А.М., Куликов Д.А., Куликов А.В., Коньков А.С., Бобров М.А., Агапов И.И., Мойсенович М.М., Молочков А.В., Гончаренко А.В., Шайтан К.В. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина для регенерации костной ткани	4	222
Чертков О.В., Валиева М.Е., Малюченко Н.В., Феофанов А.В. Анализ структуры нуклеосом в полиакриламидном геле методом Фёрстеровского резонансного переноса энергии	4	229
Микология и альгология		
Аветисян Г.А., Аветисян Т.В. Аномалии ранних стадий развития <i>Erysiphe graminis tritici</i> при окислительном стрессе	2	70
Бубнова Е.Н. Разнообразие микроскопических грибов в литоральных песках Белого моря	3	142
Камзолкина О.В., Киселица М.А., Кудрявцева О.А., Штаер О.В., Мажейка И.С. Эндоцитоз и его ингибиторы у базидиального гриба <i>Rhizostonia solani</i>	3	149
Понизовская В.Б., Дьяков М.Ю., Антропова А.Б., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Ильин В.К. Влияние условий космического полёта на жизнеспособность микромицетов	1	9
Шибзухова К.А., Гаврилова О.В., Чивкунова О.Б., Сидоров Р.А., Соловченко А.Е., Лобакова Е.С. Оценка биотехнологического потенциала и уточнение таксономического статуса микроводорослей рода <i>Parietochloris</i> (Trebouxiophyceae) коллекции CALU	3	158

Микробиология

- Закалюкина Ю.В., Бирюков М.В., Голиченков М.В., Нетрусов А.И. Фенотипическая и филогенетическая характеристика актиномицетов, выделенных из муравьёв *Lasius niger* и *Formica cunicularia* 1 16
- Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17S, для очистки промышленных стоков. 4 235
- Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Способность внеклеточных протеиназ микромицетов *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus sydowii* воздействовать на белки системы гемостаза человека 1 24
- Попова Е.А., Бедненко Д.М., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. Секретция микромицетами внеклеточных протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам 4 241

Молекулярная биология

- Аргентова В.В., Алиев Т.К., Топорова В.А., Рыбченко В.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Изучение влияния эукариотических векторов различных конструкций на экспрессию рекомбинантных антител IgA1-изотипа 2 75
- Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В., Феофанов А.В. Молекулярное моделирование взаимодействий аджитоксина 2 с потенциал-управляемым калиевым каналом Kv1.3 1 29
- Грибкова А.К., Армеев Г.А., Шайтан А.К. Исследование энергетического профиля процесса отворачивания ДНК от гистонового ядра нуклеосомы методами молекулярного моделирования 3 164
- Любителиев А.В., Студитский В.М., Феофанов А.В., Кирпичников М.П. Влияние ионов натрия и калия на конформацию линкерных участков нуклеосом 3 169
- Новоселецкий В.Н., Волынцева А.Д., Шайтан К.В., Соколова О.С. Молекулярное моделирование пространственной структуры тетрамеризационного домена калиевого канала Kv10.2 человека в различных олигомерных состояниях 2 82
- Прохорчук Е.Б., Недолужко А.В., Шарко Ф.С., Цыганкова С.В., Булыгина Е.С., Расторгуев С.М., Соколов А.С., Мазур А.М., Полилов А.А., Скрыбин К.Г. Секвенирование генома и транскриптома миниатюрного перепончатокрылого *Megaphragma amalphantum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) 1 35
- Суханова Е.В., Зименс Е.А., [Парфенова В.В.], Бельх О.И. Разнообразие генов поликетидсинтаз в геномах гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из эпилитических биопленок озера Байкал. 4 246
- Хсиех Ф.К., Козлова А.Л., Герасимова Н.С., Котова Е.Ю., Формоза Т., Студитский В.М. Роль белка Nhrb в транскрипции нуклеосом *in vitro* 4 253

Физиология

- Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Парадоксальное влияние сочетанного воздействия семакса и молибдат аммония на обучение и память крыс 3 174
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Коррекция проявлений экспериментального метаболического синдрома у крыс с помощью некоторых аргининсодержащих пептидов 2 92
- Шумов Д.Е., Арсеньев Г.Н., Свешников Д.С., Дорохов В.Б. Сравнительный анализ влияния бионауральных биений и сходных видов звуковой стимуляции на процесс засыпания: короткое сообщение 1 39

Физиология растений

- Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Кушунина М.А. Влияние дефицита азота на ионообменные свойства полимеров клеточных стенок корней пшеницы 2 87
- Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Мапелли С., Михеева Л.Е., Карбышева Е.А. Влияние ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона на содержание и спектр полиаминов в листьях и корнях дикорастущих растений 3 179

Экология

- Бельх О.И., Фёдорова Г.А., Кузьмин А.В., Тихонова И.В., Тимошкин О.А., Сороковинова Е.Г. Обнаружение микроцистинов в цианобактериальных обрастаниях различных субстратов прибрежной зоны озера Байкал 4 262
- Юзбеков А.К., Замолдчиков Д.Г. Углекислотный газообмен хвои ели европейской в южнотаёжном ельнике 2 106

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

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

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

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

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

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

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

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

Плата с авторов за публикацию не взимается.

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

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

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