

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН**

**«ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭКОСИСТЕМ
И ЗАЩИТЫ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА»**

**МАТЕРИАЛЫ
VII научно-практической школы
для молодых учёных, аспирантов и студентов
по проблемам молекулярной экологии и эволюции**

Борок, 16 – 26 октября 2014 г.

УДК 614.18:577.18.05

ББК 51.2

И-88

Редколлегия сборника:

д.б.н. Андреева А. М. (ИБВВ РАН), к.б.н. Павлова В. В. (ИБВВ РАН),

к.б.н. Заботкина Е. А. (ИБВВ РАН), Романовский А.В. (ИБВВ РАН)

Использование молекулярно-генетических методов для изучения экосистем и защиты здоровья человека. VII Научно-практическая школа для молодых учёных, аспирантов и студентов по проблемам молекулярной экологии и эволюции «Использование молекулярно-генетических методов для изучения биоразнообразия экосистем и защиты здоровья человека» (Борок, 16-26 октября 2014 г.): Материалы. Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 148 с.

Utilization of molecular-genetic methods for studies of ecosystems and human health defense. Proceedings of the VII Scientific-practical school for young scientists, post-graduates and students devoted to problems of molecular ecology and evolution "Utilization of molecular-genetic methods for studying biodiversity of ecosystems and human health defense" (Borok, 16-26 October 2014). Kostroma: Kostromskoy pechatniy dom, 2014. 148 p.

ISBN 978-5-91806-014-8

В работах, представленных в сборнике, рассмотрены вопросы молекулярной экологии и эволюции, молекулярной диагностики и медицинской иммунологии. Особое внимание уделено современным подходам геномики и протеомики. Обсуждаются вопросы о применении 2D-электрофореза и масс-спектрометрии MALDI, ПЦР и ОТ-ПЦР, технологий клонирования, секвенирования и иммунологии в биологии и в формате диагностики заболеваний человека и их профилактики.

Papers presented are devoted to molecular ecology and evolution, molecular diagnostics and medical immunology. Particular attention is given to modern approaches in genomics and proteomics. Problems of 2D-electrophoresis and mass-spectrometry MALDI, PCR and RT-PCR, cloning technologies, sequencing and immunology in biology and human diagnostics and prophylactics are discussed.

Ответственность за предоставленные материалы несут авторы.

Компьютерная верстка: Заботкина Е.А., Романовский А.В.

ISBN 978-5-91806-014-8

УДК 614.18:577.18.05

ББК 51.2

© Коллектив авторов, 2014

© ИБВВ РАН, 2014

ШКОЛА ОРГАНИЗОВАНА ПРИ ФИНАНСОВОЙ ПОДДЕРЖКЕ

РОССИЙСКОГО ФОНДА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
ПРОЕКТ № 14-34-10139

СПОНСОРЫ МЕРОПРИЯТИЯ:



BIO-RAD
www.bio-rad.com



ДИА-М
www.dia-m.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СЕКЦИЯ I

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОДХОДОВ ГЕНОМИКИ И ПРОТЕОМИКИ В ИЗУЧЕНИИ ЭКОСИСТЕМ

Использование масс-спектрометрии MALDI для идентификации белков рыб	
Андреева А.М.	7
Масс-спектрометрия MALDI-TOF для исследования белков и пептидов	
Торопыгин И.Ю.	25
Происхождение грибов	
Алёшин В.В., Михайлов К.В., Карпов С.А.	46
Перспективы молекулярной генетики в микробной экологии	
Белькова Н.Л.	49
Открытие новых таксонов зеленых водорослей: полифазный подход	
Темралеева А.Д.	55
Идентификация видовой принадлежности моллюсков с использованием молекулярных методов	
Ворошилова И.С.	73

СЕКЦИЯ II

ЗАЩИТА ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

Проблемы разработки вакцин	
Юркова М.С.	80
Методы молекулярной диагностики заболеваний	
Юркова М.С.	93
Методы молекулярной диагностики раковых заболеваний	
Кузьмина С.Ю.	99

Лейкоцитарная формула крови у лабораторных крыс с перевитым раком почки при разных методах введения флаваноидсодержащих экстрактов Мудрак Д.А., Наволокин Н.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.	109
Иммуноцитохимические и иммуногистохимические методы анализа биологической агрессивности опухоли Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.	114
Изучение цитотоксичности плазмонно-резонансных наноматериалов на микроводоросли <i>Dunaliella salina</i> Голубев А.А., Прилепский А.Ю., Богатырев В.А.	125
Динамика роста перевиваемой саркомы и изменение состояния лабораторных животных под действием экстракта аврана лекарственного Байтман Т.П., Наволокин Н.А., Полуконова Н.В.	130
Методы флуоресцентной микроскопии в клеточной биологии Прилепский А.Ю., Бибикова О.А., Голубев А.А., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н.	135
Динамика цитоморфологических изменений в культуре клеток почки эмбриона свиньи под действием флаваноидсодержащего экстракта Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.	140

СЕКЦИЯ I
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОДХОДОВ ГЕНОМИКИ И ПРОТЕОМИКИ
В ИЗУЧЕНИИ ЭКОСИСТЕМ**

УДК 597:577.322.9.088.5

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ MALDI
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВ РЫБ**

А.М. Андреева

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок
E-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru*

Использование гомологичного подхода позволяет использовать базы данных по белкам рыб с секвенированными геномами для реконструкции фрагментов аминокислотных последовательностей белков у рыб с несеквенированными геномами. В работе представлены примеры идентификации белков разных функциональных классов – иммуноглобулинов (IGL, IGH), вителлогенина, серпинов, эпендиминов и др. у модельных и немодельных видов рыб. Последние технологичные разработки позволяют секвенировать геномы практически любых организмов, а информационные системы нового поколения – аннотировать их. Данное обстоятельство выводит исследования немодельных организмов из зависимости от методов, основанных на гомологии белков разных организмов.

Ключевые слова: рыбы, протеом, 2D-электрофорез, MALDI

Work presents the examples of identification of proteins of different functional classes (ependymins, vitellogenins, immunoglobulins, serpins, albumins) from fish species with sequenced and unsequenced genomes. Most proteins except for serum albumins were identified successfully with the use of MALDI-TOF-TOF mass-spectrometry. Reconstruction of amino acid fragments was performed with help of databases of fishes with sequenced genome and mammals. Problems of fish albumin identification are connected with a high level of their structural diversity and the absence of sequence similarity with mammalian proteins.

Keywords: Pisces, proteom, 2D-electrophoresis, MALDI

Предмет и задачи протеомики

В основе всех физиологических процессов и биохимических реакций организма лежат белки и белковые взаимодействия. Исследования последних десятилетий подняли работы по белкам на качественно новый уровень, обеспеченный секвенированием генов и целых геномов, следствием чего стало появление самостоятельного раздела биологии – протеомики. Протеомика занимается инвентаризацией всех белков, закодированных в геноме организма, их взаимодействиями, посттрансляционными модификациями, структурой белков и многими другими вопросами, связанными с организацией протеома. Практическим аспектом протеомики являются исследования изменений протеома при заболеваниях; выявление белков-мишеней, на которые направлено действие лекарственных препаратов и др. Все аспекты протеомики предполагают идентификацию белков.

Самым важным объектом протеомики являются белки человека. Целью проекта «Протеом человека», стартовавшего в 2010 г. в г. Сиднее, является инвентаризация всех белков человека и выяснение взаимодействий между ними. Этот проект явился логичным продолжением проекта «Геном человека». В ходе работы по данным проектам создавались базы данных по структуре белков человека, а также их протеолитических фрагментов, полученных в стандартных условиях, что позволяет идентифицировать любые белки человека по молекулярной массе их протеолитических фрагментов, полученных в тех же условиях. По такой схеме можно идентифицировать и любой белок у вида с секвенированным геномом. Идентификацию белков проводят по масс-спектрам (MS) их протеолитических фрагментов, используя современную технологию матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации или MALDI.

Стратегию работ по идентификации белка можно выразить простой схемой: 2D-E (двумерный электрофорез) – трипсинолиз белка в фрагментах ПАА-геля – масс-спектрометрия MALDI – идентификация белка с использованием баз данных NCBI.

На первом этапе работы белковую смесь с помощью 2D-электрофореза разделяют на отдельные белки или полипептиды – продукты отдельных генов. Наибольшим разрешением обладает система, в которой в первом направлении используют изофокусирование (Гааль и др., 1982), а во втором – SDS-электрофорез (Laemmli, 1970). В этой системе сложные биологические образцы можно дифференцировать на тысячу и более полипептидов (Рис. 1). В зависимости от специфики исследования в первом направлении могут использоваться и другие системы разделения белков, например, диск-электрофорез (Davis, 1964; Ornstein, 1964).

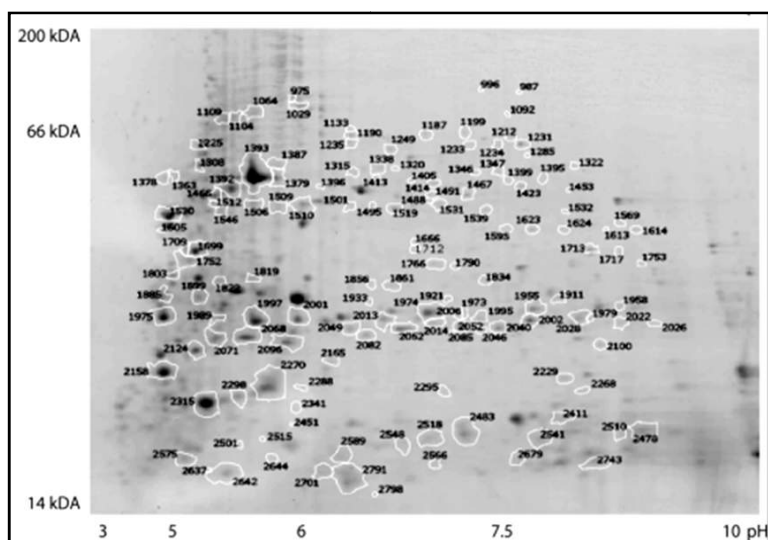


Рис. 1. 2D-E лизата клеток эмбриона *Danio rerio* (Lucitt et al., 2008).

Второй этап работ – это MALDI-масс-спектрометрия, которая нашла свое широкое применение для анализа нелетучих высокомолекулярных соединений, в том числе и белков и пептидов. Масс-спектры MS получают на тандемном MALDI - времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в тандемном режиме (Гоуфман и др., 2006) (Рис. 2).



Рис. 2. Времяпролетная MALDI-масс-спектрометрия, приборный парк.

Это метод «мягкой» ионизации, когда импульсы лазерного излучения воздействуют на матрицу с анализируемым веществом. Матрица представляет собой материал, смягчающий деструктивное воздействие лазерного излучения и снижающий ионизацию анализируемого вещества. Фотоны лазерного луча ионизуют и испаряют матрицу мишени, на которую нанесен образец, а образующиеся из матрицы ионы ионизуют молекулы образца, не разрушая их. Точный механизм MALDI ионизации неизвестен, однако в результате образуются, как правило, однозарядные ионы, захватившие протон либо иной катион (Рис. 3).

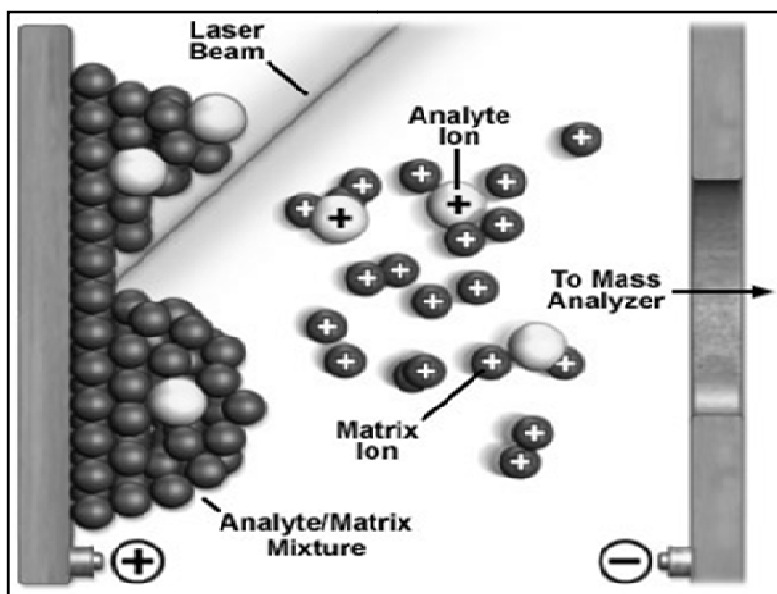


Рис. 3. Схема действия лазерного луча на матрицу мишени, ионизации молекул анализируемого вещества и детекции сигнала на масс-спектрометре.

Образцы для масс-спектрометрии получают из полиакриламидного геля после электрофореза белков. Кусочек геля, содержащий белок, дважды промывают для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1 М NH_4HCO_3 в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляют по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, добавляют к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05М NH_4HCO_3 в концентрации 15 мкг/мл. Гидролиз проводят в течение 4 ч при 40°C, затем к раствору добавляют 7 мкл 0.5% трифторуксусной кислоты в 10%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно

перемешивают (Гоуфман и др., 2006). Надгелевый раствор используют для получения масс-спектров.

Обработка масс-спектров проводится с помощью программного пакета FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт», www.matrixscience.com) проводят поиск в базе данных NCBI среди белков всех организмов. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI считают определенными надежно ($p < 0.05$). При необходимости получают спектры фрагментации MS/MS отдельных пептидов в тандемном режиме. И на заключительном этапе с использованием программного обеспечения Biotoools 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) проводят поиск кандидатов (гомологов) по MS и MS/MS.

1. Модельные и немодельные объекты

Оба проекта – «Геном человека» и «Протеом человека» – внесли серьезные изменения в современные технологии и в биомедицинскую науку в целом. Но, кроме этого, их значимость проявилась в инициации работ по секвенированию геномов и исследованию протеомов других организмов, в том числе и рыб. На сегодняшний день среди рыб число видов с секвенированными геномами невелико: данио *Danio rerio*, фугу *Takifugu rubripes*, слоновые акулы *Elephantshark* и *Callorhinchus milii*, атлантический лосось *Salmo salar*, атлантическая треска *Gadus morhua*, карп *Cyprinus carpio*, зеленый тетрадон *Tetraodon nigroviridis* и др. Информация о геномах этих рыб собрана в различных базах данных: ZFIN – Zebrafish Information Network (<http://zfin.org/>), cGRASP–consortium for Genomics Research on All Salmon Project (<http://web.uvic.ca/grasp/>) и других. Для перечисленных видов инвентаризация белков является реальной задачей. Но число видов с нерасшифрованным геномом несоразмерно больше. И, как правило, именно эти виды и являются объектами эволюционных и экологических исследований.

Для исследования протеомов этих организмов также существуют подходы. Один из них основан на гомологии белков. В его основе лежит понимание того, что в эволюции позвоночных все основные типичные для них белковые семейства появились в низших таксонах – у рыбообразных и рыб – и что все основные эволюционные преобразования белков были в основном завершены в этих таксонах. По этой причине созданные базы данных по геномам и белкам млекопитающих могут в ряде случаев использоваться для идентификации белков организмов низших *Vertebrata*, в т.ч. и рыб. Разумеется, это касается лишь тех случаев, когда продукты ортологичных генов имеют гомологичные последовательности. Такой подход подразумевает параллельно идущий

сбор информации и формирование собственных баз данных по геномам и белкам организмов из низших таксонов, в том числе и рыб.

2. Идентификация белков у модельных и немодельных видов рыб на примере белков плазмы и тканевой жидкости организма

Рассмотрим примеры идентификации некоторых белков из биологических жидкостей организма рыб: 1) сывороточных иммуноглобулинов (легких IGL и тяжелых IGH цепей); 2) предшественника желточного белка липовителлина Са-фосфолиппротеина вителлогенина из плазмы; 3) нейросекреторных белков эпендиминов из мозговой жидкости; 4) сывороточных трансферринов; 5) альбуминоподобного белка плазмы.

Плазму заслуженно считают одним из наиболее сложных образцов для протеомики (Anderson, Anderson, 2002). То же самое можно сказать и про тканевые жидкости организма, являющиеся фильтратами плазмы. Помимо «истинных белков плазмы» – внеклеточных белков, предшественники которых содержат на N-конце сигнальный пептид – эти жидкости в незначительном количестве содержат тканевые белки, попавшие в кровоток вследствие разрушения клеток, а также белки некоторых вирусов, бактерий и дрожжей (Anderson et al., 2004; Liotta, Petricoin, 2006). Техника 2D-электрофореза позволила дифференцировать плазму на десятки белков (Bowman et al., 2011; Babaei et al., 2013). В их составе с помощью масс-спектрометрии MALDI и SELDI (прямая масс-спектрометрия без 2D-E) идентифицировано более тысячи полипептидов (Zhang et al., 2004; Luczak et al., 2011), относящихся к истинным белкам плазмы и другим белкам организма, как у высших, так и у низших *Vertebrata*.

В качестве объектов нами были отобраны представители хрящевых ганоидов (стерлядь) и костистых рыб (брахиданио рерио, карп, дальневосточная красноперка). Среди них – виды с секвенированным (*Daniorerio*) и частично секвенированным (*Cyprinus carpio*) геномами, представленными в DB Proteins NCBI 77641 и 4417 последовательностями соответственно; а также виды с несеквенированными геномами, представленные в DB Proteins незначительным количеством последовательностей – дальневосточная мелкочешуйная красноперка *Tribolodon brandtii* представлена 64 последовательностями; стерлядь *Acipenser ruthenus* – 89 последовательностями.

Для решения задач идентификации белков плазмы и мозговой жидкости в качестве удобной 2D-E системы мы выбрали диск-электрофорез (первое направление) / SDS-электрофорез (второе направление) для отслеживания принадлежности того или иного белка на

2D-E одной из четырех основных фракций белков плазмы – альбуминам, альфа-, бэта- и гамма-глобулинам по Тизелиусу (Tiselius, 1937).

Выбранные нами для анализа белки (перечислены выше) имеют разную структуру и выполняют разные функции:

Иммуноглобулины IG (антитела) являются частью иммунной системы организма. Относятся к суперсемейству белков с Y-образной пространственной организацией, способных связывать антигены, которые стимулируют их образование. IG продуцируются В-лимфоцитами и находятся либо в свободном виде в крови и других жидкостях организма (секреторная форма), либо в виде рецепторов на поверхностных мембранах клеток (мембранная или рецепторная форма). В плазме крови IG содержатся в составе фракции гамма-глобулинов. Молекула IG включает в себя две легкие (L) и две тяжелые (H) цепи – IGL и IGH, связанные S-S-связями: каждая H-цепь связана с L-цепью одной S-S-связью, две H-цепи связаны двумя S-S-связями (Rogers et al., 2006).

Вителлогенин Vg входит в состав семейства белков, транспортирующих липиды и содержащих в структуре консервативный домен «lipid transport domain». Это димерный белок, структурную формулу которого можно представить как $Vg = \text{lipid}[(Lv-Pv)]_2$, где Lv – липовителлин, Pv – фосвитин (Anderson et al., 1998; Babin et al., 1999; Wang et al., 2000). Белок синтезируется в печени, после чего поступает в кровь в виде Ca-фосфолипопротеина. У рыб в норме Vg отсутствует в крови самцов и имеется в незначительных количествах в крови самок; после эстрадиоловой индукции его содержание в крови самок резко увеличивается, а у самцов белок появляется в крови. Данным обстоятельством обусловлен интерес к Vg как индикатору загрязнений водоемов, так как некоторые сбрасываемые в водоемы соединения, например эндокринные дизрупторы (EDs) с эстрогенными свойствами, имитируют действие эстрогенов и приводят к феминизации популяций рыб (Sonnenschein, Soto, 1998).

Эпндимины Epd – нейросекреторные белки. Впервые обнаружены в составе белков спинномозговой жидкости костистых рыб и какое-то время считались специфичными для мозга рыб белками (Shashoua, 1991; Sterrer et al., 1990; Tang et al., 1999). Позднее были определены у амфибий и в разных тканях млекопитающих (Apostolopoulos et al., 2001; Nimmrich et al., 2001) и беспозвоночных (Suárez-Castillo et al., 2007). В мозговую жидкость попадают в результате нейросекреции. У рыб их связывают с долговременной памятью и поведением (Rinder et al., 1992); у Mammalia они особо выражены при ряде патологий (Nimmrich et al., 2001).

Трансферрины. Белки из семейства трансферринов регулируют в организме уровень железа (Aisen et al., 1976; Harris, Aisen, 1989). К этому семейству относят трансферрин TFs, лактоферрин LTFs, овотрансферрин oTFs и меланотрансферрин (Woodbury et al., 1980; Wally et al., 2006; Wally,

Buchanan, 2007). Синтезируются в печени. У всех млекопитающих это мономерные гликопротеиды с ММ около 80 кДа. Полипептидная цепь состоит из двух доменов. Структуру молекулы стабилизируют 18 дисульфидных связей, количество которых различается у разных белков семейства (Wally, Buchanan, 2007). Молекула трансферрина имеет два сайта связывания Fe^{3+} .

Альбумин относится к белковому суперсемейству, в которое входят также альфа-фетопротеин, витамин D-связывающий белок и афамин (Schoentgen et al., 1986; Haefliger et al., 1989; Lichenstein et al., 1994). Синтезируется в печени. Образуется из предшественника препроальбумина (Minchiotti et al., 2008). Единственная полипептидная цепь молекулы альбумина человека состоит из трех доменов и спиральной структуры, каждый домен состоит из двух субъединиц, соединенных S-S-мостиками (He, Carter, 1992). Всего в структуре альбумина 17 S-S-связей (Saber et al., 1977) и одна свободная SH-группа (Sugio et al., 1999). За счет свободной поверхностной SH-группы альбумин *in vivo* может образовывать димеры, тримеры и тетрамеры, являющиеся мономерными белками. Альбумины участвуют в транспорте гормонов, жирных кислот, метаболитов и ионов (Lu et al., 2008). В электрофорезе альбумины млекопитающих представлены одним макрокомпонентом (Тинаева и др., 2007), у рыб их, как правило, характеризует множественность. Альбумины рыб и млекопитающих близки по свойствам, но не гомологичны (Andreeva, 2012). Исключение составляют альбумины двоякодышащих рыб, которые гомологичны альбуминам Mammalia (Metcalf et al., 2003).

3.1. Идентификация иммуноглобулинов стерляди – легких IGL и тяжелых IGH цепей

Идентификация сывороточных IGL стерляди. Идентификация L-цепи иммуноглобулинов в протеоме сыворотки крови стерляди с помощью MALDI проходит по относительно простому сценарию, так как нуклеотидные последовательности экспрессированных IGL-генов стерляди в отличие от IGH представлены в DBProteins NCBI 9-ю последовательностями.

У рыб на электрофореграмме в зоне подвижности гамма-2-глобулинов кроме иммуноглобулинов находятся высокомолекулярные глико- и липопротеиды. После электрофореза два низкомолекулярных белка с ММ около 25 кДа (наиболее близкой к мол. массе IGL) были проверены на предмет принадлежности к IGL: для этого белки 1 и 2 (Рис.4) вырезали из геля и делали MS их протеомных карт.

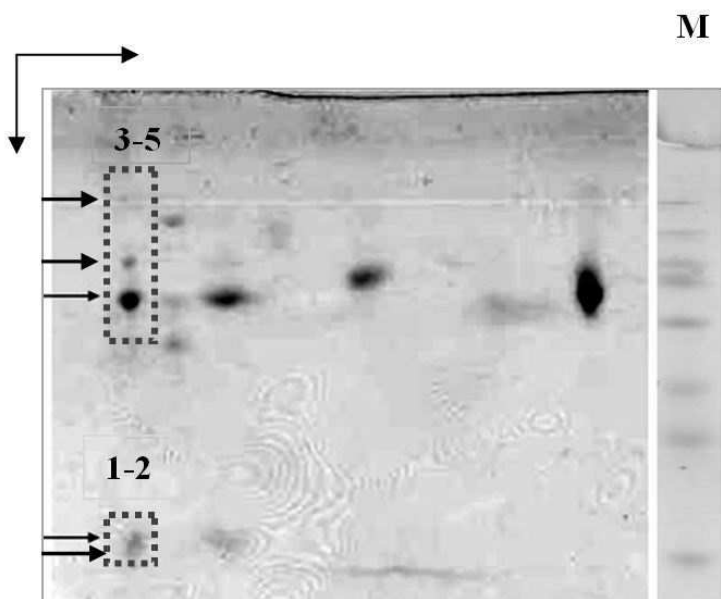


Рис. 4. 2D-SDS-E сыворотки крови стерляди. 1-2 – IGL, 3-5 – IGH. М – маркер молекулярной массы Fermentas.

Поиск гомологов по MS в программе Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) выявил для белков 1 и 2 несколько кандидатных белков, среди которых IGL стерляди *Acipenser ruthenus* с максимальным критерием достоверности *score* 151. Аминокислотная последовательность кандидата состоит из 246 остатков, мол. масса 26319 Да. Перекрытие с исследуемым белком стерляди составило 54 % (gi|4455795). Поиск гомологов по MS/MS подтвердил полученные результаты и показал, что исследуемые белки 1 и 2 являются IGL каппа-типа.

Идентификация IGH из сыворотки крови стерляди. На 2D-SDS-E среди сывороточных гамма-2-глобулинов стерляди, помимо низкомолекулярных IGL, присутствуют белки с более высокими показателями мол. массы. Три белка – с мол. массой около 130, 75 и 65 кДа (белки 3-5, Рис. 4) были проверены на принадлежность к IGH. Совокупный поиск по MS и MS/MS не выявил для 130 кДа-белка ни одного адекватного кандидата. Поиск по MS для белка с мол. массой около 75 кДа выявил с низкими величинами достоверности в качестве кандидатов IGH русского и сибирского осетра, а также человека: immunoglobulin heavy chain constant region [*Acipenser gueldenstaedtii*] (*score* 63); immunoglobulin heavy chain [*Acipenser baerii*] (*score* 54); immunoglobulin heavy chain variable region [*Homo sapiens*] (*score* 48) (Mascot NCBI bony vertebr MS). Поиск по MS/MS подтвердил эти результаты – в качестве кандидатов с высокими показателями *score* были

IGH сибирского осетра, белуги, русского и амурского осетров, а также человека: immunoglobulin heavy chain [Acipenser baerii] (score 163); immunoglobulin heavy chain constant region [Huso huso] (score 157); immunoglobulin heavy chain constant region [Acipenser gueldenstaedtii] (score 157); immunoglobulin heavy chain [Acipenser baerii] (score 150); immunoglobulin heavy chain constant region [Acipenser schrenckii] (score 133); immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens] (score 57) (Mascot NCBI chordata MS/MS).

Сравнение MS показало, что субъединицы с мол. массами 75 и 65 кДа являются гомологами; при этом они не гомологичны белку с ММ 130 кДа. Таким образом, белки стерляди с мол. массами 65 и 75 кДа являются тяжелыми цепями иммуноглобулинов IGH.

3.2. Идентификация вителлогенина

дальневосточной мелкочешуйной красноперки

На 2D-SDS-E белков сыворотки крови самок рыб с гонадами IV стадии зрелости (как и у других карповых) на дорожке сывороточных гамма-1-глобулинов белок Vg находится, как правило, в области высокомолекулярных белков (Рис. 5). На этой же дорожке располагается низкомолекулярная субъединица с мол. массой около 26 кДа, которую мы попытались идентифицировать.

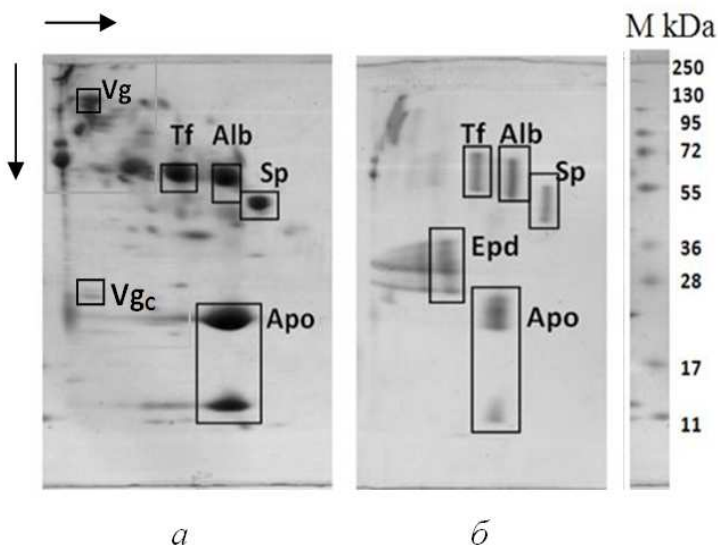


Рис. 5. 2D-SDS-E плазмы (а) и мозговой жидкости (б) дальневосточной мелкочешуйной красноперки. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus Fermentas. Vg, Tf, Apo, Alb, Sp– обозначения белков, пояснения в тексте.

Для ее идентификации (Рис. 5, белок Vg_C) мы получали MS ее протеомной карты и спектры фрагментации MS/MS и проводили по ним поиск. Поиск гомологов по MS не дал приемлемых результатов.

Кандидатные последовательности были представлены, в основном, библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК трески *Gadus morhua* (score 80), черного толстоголова *Pimephales promelas* (score 79) и других рыб (Mascot EST vertebrates). Поэтому поиск гомологов был продолжен по MS/MS пептидной карты белка. Среди кандидатов этого белка оказались вителлогенины (предшественники) разных видов рыб: 1) vitellogenin precursor [*Pimephales promelas*] (score 312); vitellogenin [*Carassius auratus*] (score 289); vitellogenin 1 precursor [*Danio rerio*] (score 268); vitellogenin 7 precursor [*Danio rerio*] (score 262); vitellogenin B1 [*Cirrhinus molitorella*] (score 247); и др. (Mascot NCBI). Таким образом, низкомолекулярная субъединица мол. массой около 26 кДа представляет собой С-концевой фрагмент вителлогенина красноперки.

3.3. Идентификация эпендиминов из мозговой жидкости дальневосточной мелкочешуйной красноперки

Плазма и мозговая жидкость МЖ содержали одинаковый набор белков – трансферринов (Tf), альбуминов (Alb), серпинов (Sp) и аполипопротеинов (Apo) (Рис. 5). И только одна фракция отсутствовала в ПК и присутствовала в МЖ – фракция из пяти белков с мол. массой в диапазоне от 26 до 32 кДа (Рис. 5). Масс-спектры их пептидных карт совпали, что свидетельствует об идентичности белков (Рис. 6).

Поиск гомолога по MS в программе Mascot выявил кандидатные последовательности с невысокими величинами достоверности (score 72), представленные библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК мозга *Danio rerio* (Mascot EST vertebrates). Поиск кандидатов по спектрам фрагментации MS/MS показал высокую достоверность результатов (score>200). Среди кандидатов оказались предшественники эпендиминов солнечной рыбы, карася, брахиданио и других видов рыб: 1) Ependymin; Short=EPD; Flags: Precursor [*Notemigonus crysoleucas*] (gi|2494358, score 280); 2) Ependymin II precursor [*Carassius auratus*] (gi|585104, score 247); 3) Ependymin precursor [*Danio rerio*] (gi|18858633, score 247); и др. Таким образом, специфичные для МЖ белки с мол. массой от 26 до 32 кДа являются эпендиминами.

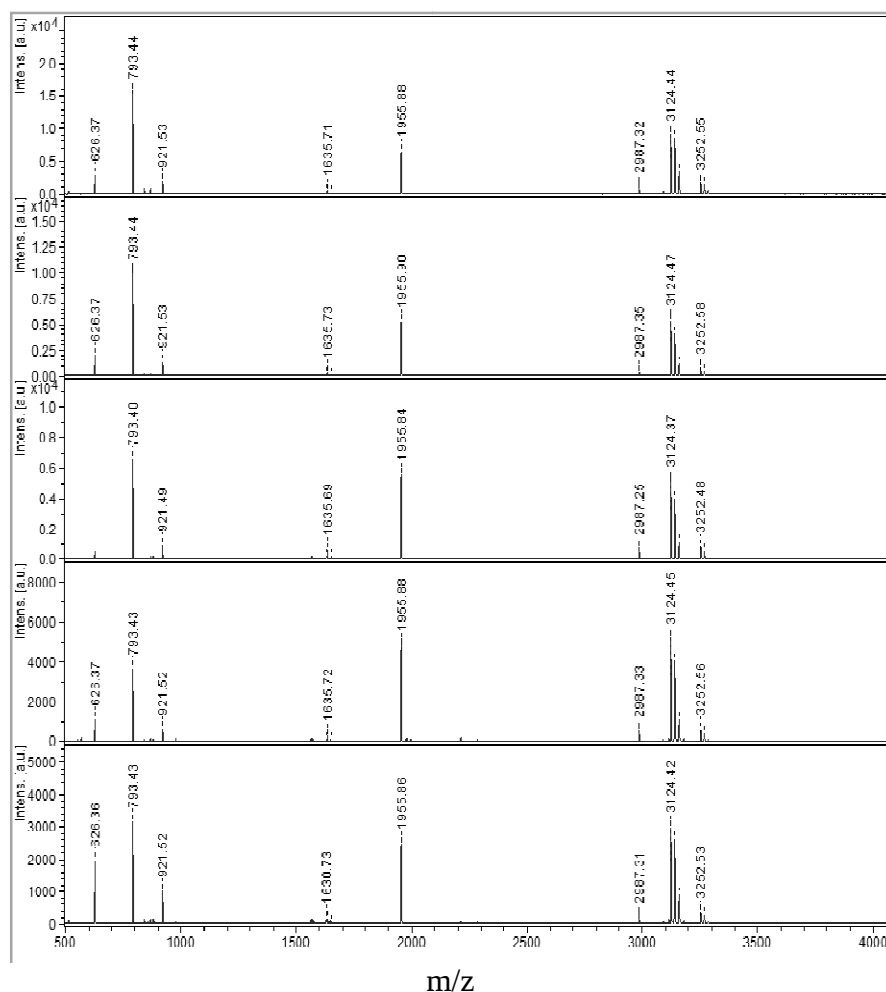


Рис. 6. Масс-спектры пяти нейроспецифичных белков из мозговой жидкости красноперки. По оси абсцисс – отношение массы к заряду, по оси ординат – интенсивность сигнала.

3.4. Идентификация сывороточных трансферринов у карпа и дальневосточной красноперки

Предварительно после диск-электрофореза сыворотки трансферрины выявляли реактивом Мюллера (Palmour, Sutton, 1971). После 2D-SDS-E из геля вырезали два фрагмента, расположенные на «дорожке» положительных по Мюллеру белков; проводили их трипсинолиз и получали MS протеомной карты белков (Рис. 7).

Масс-спектры положительных по Мюллеру белков у карпа оказались идентичными, что свидетельствует о гомологии белков. Поиск в NCBI подтвердил предположение о том, что белки являются трансферринами (gi|189473159, gi|189473165, gi|189473161, gi|189473163).

При идентификации сывороточных трансферринов у дальневосточной красноперки кандидатными белками оказались те же трансферрины карпа (gi|189473159, gi|189473165, gi|189473161, gi|189473163).

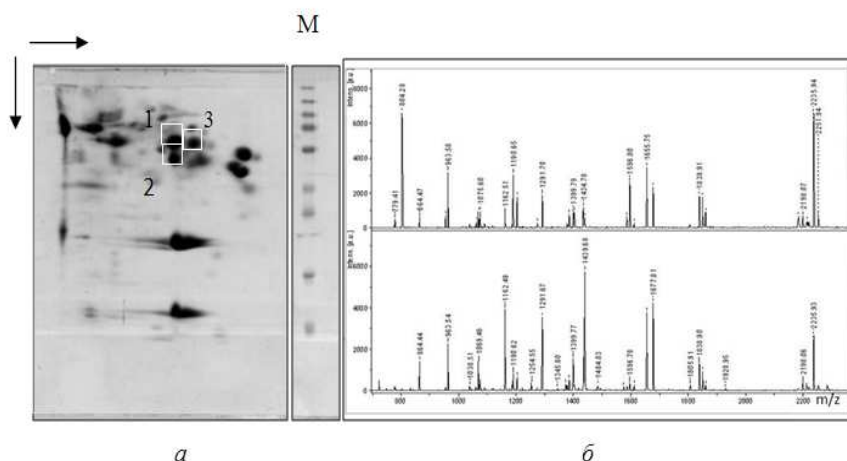


Рис. 7. 2D-SDS-E сыворотки крови карпа (а; белки 1 и 2 – трансферрины, белок 3 - альбумин) и масс-спектры (б) двух положительных по Мюллеру белков (белки 1 и 2, выделены белыми рамками, а). М – маркер мол. массы.

3.4. Идентификация альбуминоподобного белка из плазмы карпа, брахиданио рерио и дальневосточной красноперки

Для альбуминоподобного белка карпа, связывающего в диске-электрофорезе альбуминспецифичный краситель синий Эванса (Рис. 7, белок 1), кандидатным белком оказался участвующий в тепловых адаптациях белок серебряного карпа «warm temperature acclimation-related 65 kDa protein» [*Hypophthalmichthys nobilis*] (silver carp) (GenBank ACO51168.1, score 173). Белок содержит в структуре «Hemopexin-like»-повторы, связывает гем и транспортирует его в печень (GenBank ACO51168.1).

Аналогично белку, связывающему синий Эванса у карпа, подобный белок плазмы дальневосточной красноперки (Рис. 5, белок «Alb») также оказался участвующим в тепловых адаптациях белком – «warm temperature acclimation-associated 65 kDa protein [*Misgurnus mizolepis*]» (GenBank AEM6043.1, score 451). Как и кандидат белка карпа, кандидат белка красноперки содержит в структуре гемопексин-подобные повторы, связывает гем и транспортирует его в печень (Cho et al., 2012). У брахиданио рерио белок, связывающий синий Эванса, оказался гемопексином – hemopexin precursor [*Danio rerio*] (gi|162287365, score 302). Таким образом, у всех исследованных рыб сывороточный белок, связывающий синий Эванса, проявлял свойства гемопексина.

Заключение

Представленные в докладе данные отражают общую тенденцию относительно более успешной идентификации глобулинов плазмы, а также консервативных белков по сравнению с альбуминоподобными белками. Возможно, это связано с тем, что организация глобулинов не претерпела в ходе эволюции позвоночных столь существенных преобразований, как в случае альбуминов, вероятно, по причине узкой специфичности и важности выполняемых глобулинами функций и направленности отбора на сохранение этих функций. Между тем, множественные низкомолекулярные фракции плазмы рыб (в т.ч. альбумины) активно преобразуются при адаптациях организма к меняющимся условиям среды, как внешней, так и внутренней (Andreeva, 2012).

Наличие консервативных последовательностей в структуре белков рыб упрощает поиск гомологов и их идентификацию. Результаты работы показали, что эпендимины, содержащие в своей структуре консервативные последовательности, вполне успешно идентифицируются у рыб с несеквенированным геномом с использованием MALDI в тандемном режиме.

Проблемы идентификации множественных альбуминоподобных белков рыб обусловлены высочайшим уровнем их структурного разнообразия, являющегося в свою очередь следствием активного участия данных белков в адаптациях водного и пластического обмена организма к условиям внешней и внутренней среды. Слабая антигенная идентичность альбуминоподобных белков рыб из разных таксонов подтверждает различия их поверхностных структур (Зорин и др., 1994). Сравнение аминокислотных последовательностей альбуминов у атлантического лосося, человека и других млекопитающих не выявило у Pisces и Mammalia никаких общих мотивов: при трипсинолизе этих белков у рыб и млекопитающих одинаковые пептиды не образуются; при том, что альбумины некоторых видов рыб (лососевые) подобно альбуминам млекопитающих имеют в структуре молекулы три домена (UniProtKB/SwissProt). Только у осетрообразных и двоякодышащих рыб в структуре генов альбуминов обнаружены мотивы, сходные с мотивами альбуминов млекопитающих (Metcalf et al., 2003, 2007).

Такое разнообразие альбуминов у позвоночных в целом, и их кардинальное несовпадение, с одной стороны, у рыб на межродовом и межотрядном уровне, а с другой – у рыб и высших позвоночных, обусловлено особенностями эволюции генов, кодирующих эти белки. Считается, что гены альбумина у всех позвоночных имеют общее, но независимое происхождение из анцестрального гена гемоглобина или миоглобина, который в свою очередь также независимо в каждом таксоне произошел от генов, кодирующих цитохромы. В процессе эволюции ген

гемоглобина претерпел серию сплавленных дупликаций. На основе одного из его фрагментов и образовался ген альбумина (Шмидт-Ниельсен, 1982).

Из вышесказанного следует, что базы данных по белкам млекопитающих не всегда пригодны для идентификации белков рыб. Между тем, базы данных по белкам рыб с секвенированными геномами могут помочь в реконструкции фрагментов аминокислотных последовательностей белков у рыб с несеквенированным геномом. Последние технологичные разработки позволяют секвенировать геномы практически любых организмов, а информационные системы нового поколения аннотировать их, то есть считывать аминокислотные последовательности отдельных белков с генетической матрицы (Armengaud et al., 2014). Данное обстоятельство выводит исследования немодельных организмов из зависимости от методов, основанных на гомологии белков разных организмов (Armengaud et al., 2014; Papakostas et al., 2014).

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 13-04-00427-а).

Список литературы

Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Лохов П.Г., Згода В.Г., Серебрякова М.В., Торопыгин И.Ю., Власова М.А., Арчаков А.И., Сафарова М.Р., Макаров О.В. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 4. С. 445–453.

Зорин Н.А., Жабин С.Г., Лыкова О.Ф., Зорина В.Н., Белогорлова Т.И., Чирикова Т.С. Сравнительное изучение физико-химических и антигенных свойств альбуминов человека и животных // Журн. сравнит. биохимии и физиологии. 1994. Т. 30. № 4. С. 505–511.

Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. Москва: Мир, 1982. 446 с.

Тинаева Е.А., Маркович Л.Г., Конкина В.В., Семикрасова Е.А.О возможности использования полиморфизма белков крови как показателя отбора в пушном звероводстве // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 1. № 1. С.122–130.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. В 2-х кн. М.: Мир, 1982.

Aisen P., Leibman A., Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin // Birth. Defects. Orig. Artic. Ser. 1978. V.12 .№ 8. P. 81–95.

Andreeva A.M. Structural and functional organization of fish blood proteins. New York: Nova Science Publisher, 2012. 188 p.

Anderson T.A., Levitt D.G., Banaszak L.J. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein // Structure. 1998. V. 6. № 7. P. 895–909. doi:10.1016/S0969-2126(98)00091-4.

Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects // *Mol. Cell. Proteomics*. 2002. V. 1. P. 845–867.

Anderson N.L., Polanski M., Pieper R., Gatlin T., Tirumalai R.S., Conrads T.P., Veenstra T.D., Adkins J.N., Pounds J.G., Fagan R., Lobley A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources // *Mol. Cell Proteomics*. 2004. V. 3. № 4. P. 311–326.

Apostolopoulos J., Sparrow R.L., McLeod J.L., Collier F.M., Darcy P.K., Slater H.R., Ngu C., Gregorio-King C.C., Kirkland M.A. Identification and characterization of a novel family of mammalian ependymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues // *DNA Cell Biol.* 2001. V. 20. P. 625–635.

Armengaud J., Trapp J., Pible O., Geffard O., Chaumot A., Hartmann E.M. Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics // *J. Proteomics*. 2014. V. 105. P. 5–18.

Bouwman F.G., Roos B., Rubio-Aliaga I., Crosley L.K., Duthie S.J., Mayer C., Horgan G., Polley A.C., Heim C., Coort S., Evelo C.T., Mulholland F., Johnson I.T., Elliott R.M., Daniel H., Mariman E. 2D-electrophoresis and multiplex immunoassay proteomic analysis of different body fluids and cellular components reveal known and novel markers for extended fasting // *BMC Med. Genomics*. 2011. V. 4. № 24. P. 1–12.

Babaei F., Ramalingam R., Tavendale A., Liang Y., Yan L.S., Ajuh P., Cheng S.H., Lam Y.W. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 4. P. 1580–1590.

Babin P.J., Bogert J., Kooiman F.P., Van Marrewijk W.J.A., Van der Horst D.J. Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor // *J. Mol. Evol.* 1999. V. 49. № 150. P. 1–9.

Cho Y.S., Kim B.S., Kim D.S., Nam Y.K. Modulation of warm-temperature-acclimation-associated 65 kDa-protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 32. № 5. P. 662–669.

Davis B.J. Disc-electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964. V. 121. P. 404–427.

Gettins P.G.W. Serpin structure, mechanism and function // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. P. 4751–803.

Haefliger D.N., Moskaitis J.E., Schoenberg D.R., Wahli W. Amphibian albumins as members of the albumin, alpha-fetoprotein, vitamin D-binding protein multigene family // *J. Mol. Evol.* 1989. V. 29. № 4. P. 344–354.

Harris D.C., Aisen P. Iron carriers and iron proteins. New York: VCH Publishers, 1998.

He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin // *Nature*. 1992. V. 358. P. 209–215.

Irving J.A., Pike R.N., Lesk A.M., Whisstock. Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function // *Genome Res.* 2000. V. 10. P. 1845–1864. PMID 11116082.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature*. 1970. V. 227. № 4. P. 680–685.

Lichenstein H.S., Lyons D.E., Wurfel M.M., Johnson D.A., McGinley M.D., Leidli J.C., Trollinger D.B., Mayer J.P., Wright S.D., Zukowski M.M. Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 27. P. 18149–18154.

Liotta L.A., Petricoin E.F. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. № 1. P. 26–30.

Lu J., Stewart A.J., Sadler P.J., Pinheiro T.J., Blindauer C.A. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. P. 1317–1321.

Lucitt M.B., Price T.S., Pizarro A., Wu W., Yocum A.K., Seiler C., Pack, M.A., Blair I.A., FitzGerald G.A., Grosser T. Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development // *Mol. Cell Proteomics.* 2008. V. 7. № 5. P. 981–994.

Luczak M., Formanowicz D., Pawliczak E., Wanic-Kossowska M., Wykretowicz A., Figlerowicz M. Chronic kidney disease-related atherosclerosis - proteomic studies of blood plasma // *Proteome Sci.* 2011. V. 9. № 25. P.1–12.

Metcalf V., Brennan St., Georg P. Using serum albumin to inter vertebrate phylogenies // *Applied bioinformatics.* 2003.V. 2 (3 Suppl). P. 97–107.

Metcalf V.J., George P.M., Brennan S.O. Lungfish albumin is more similar to tetrapod than to teleost albumins: purification and characterization of albumin from Australian lungfish, *Neocaratodus forsteri* // *Comp. biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and molecular biology.* 2007. V. 147. № 3. P. 428–437.

Minchiotti L., Galliano M., Kragh-Hansen U., Peters T. Jr. Mutations and polymorphisms of the gene of the major human blood protein, serum albumin // *Hum. Mutat.* 2008. V. 29. № 8. P. 1007–1016.

Nimmrich I., Erdmann S., Melchers U., Chtarbova S., Finke U., Hentsch S., Hoffmann I., Oertel M., Hoffmann W., Muller O. The novel ependymin related gene *UCC1* is highly expressed in colorectal tumor cells // *Cancer Lett.* 2001. V. 165. P. 71–79.

Ornstein L. Disc-electrophoresis. I. Background and theory // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964. V. 121. P. 321–349.

Papakostas S., Vasemägi A., Himberg M., Primmer C.R. Proteome variance differences within populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus*) originating from contrasting salinity environments // *J. Proteomics.* 2014. V. 105. P. 144–150.

Palmour R.M., Sutton H.E. Vertebrate transferrins molecular weight, clinical composition and iron binding studies // *Biochem.* 1971. V. 10. P. 4026–4032.

Rinder H., Bayer T.A., Gertzen E.M., Hoffmann W. Molecular analysis of the ependymin gene and functional test of its promoter region by transient expression in *Brachydanio rerio* // *DNA Cell. Biol.* 1992.V. 11. P. 425–432.

Rogers K.A., Richardson J.P., Scinicariello F., Attanasio R. Molecular characterization of immunoglobulin D in mammals: immunoglobulin heavy constant delta genes in dogs, chimpanzees and four old world monkey species // *Immunology.* 2006. V. 118. № 1. P. 88–100.

Saber M.A., Stockbauer P., Moravek L., Meloun B. Disulfide bonds in human serum albumin // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1977. V. 42. P. 564–579.

Sargent T.D., Yang M., Bonner J. Nucleotide sequence of cloned rat serum albumin messenger RNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. V. 78. P. 243–246.

Schoentgen F., Metz-Boutique M.H., Jolles J., Constans J., Jolles P. Complete amino acid sequence of human vitamin D-binding protein (group-specific component): evidence of a three-fold internal homology as in serum albumin and alpha-fetoprotein // *Biochem. Biophys. Acta.* 1986. V. 871. № 2. P. 189–198.

Shashoua V.E. Brain protein metabolism and the acquisition of new patterns of behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V.74. P. 1743–1747.

Shashoua V.E. Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity// *Ann. NY Acad. Sci.* 1991. V. 627. P. 94–114.

Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Church F.C., Coughlin P.B., Gettins P.G., Irving J.A., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J., Whisstock J.C. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276 . P. 33293 – 33296. PMID 11435447.

Sonnenschein C., Soto A.M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics, antagonists // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998. V. 65. P. 143–150.

Sterr S., Konigstorfer A., Hoffmann W. Biosynthesis and expression of ependymin homologous sequences in zebrafish brain // *Neuroscience.* 1990. V. 37. P. 277–284.

Suarez-Castillo E.C., Garcia-Ararras J.E. Molecular evolution of the ependymin protein family: a necessary update // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. P. 23. Doi: 10.1186/1471-2148-7-23.

Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5Å resolution // *Protein Eng.* 1999. V. 12. № 6. P. 439 – 446.

Tang S.J., Sun K.H., Sun G.H., Lin G., Lin W.W., Chuang M.J. Cold-induced ependymin expression in zebrafish and carp brain: implications for cold acclimation // *FEBS Lett.* 1999. V.459. P. 95–99.

Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin: electrophoretic analysis of normal and immune sera // *Biochem. J.* 1937. V. 31. P. 1464–1472.

Wally J., Halbrooks P.J., Vonnheim C., Rould M.A., Everse S.J., Mason A.B., Buchanan S.K. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 34. P. 24934–24944.

Wally J., Buchanan S.K. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin // *Biometals.* 2007. V. 20. № 3-4. P. 249–262.

Wang H., Yan T., Tan J.T.T., Gong Z. A zebrafish vitellin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosphotyrosine domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene // *Gene.* 2000. V. 256. P. 303–310.

Woodbury R.G., Brown J.P., Yeh M.Y., Hellstrom I., Hellstrom K.E. Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980. V. 77. P. 2183–2187.

Zhang Z., Bast R.C., Yu Y., Li J., Sokoll L.J., Rai A.J., Rosenzweig J.M., Cameron B., Wang Y.Y., Meng X.Y., Berchuck A., Van Haaften-Day C., Hacker N.F., de Bruijn H.W., van der Zee A.G., Jacob, I.J., Fung E.T., Chan D.W. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 16. P. 5882–5890.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ MALDI-TOF ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

И.Ю. Торопыгин

*Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им В.Н. Ореховича
119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
E-mail: toropygin@rambler.ru*

Масс-спектрометрия MALDI-TOF является универсальным и популярным методом анализа биологических образцов. Настоящая работа представляет собой обзор теории, оборудования для измерений и применения MALDI как аналитического метода в биохимии и молекулярной биологии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия MALDI-TOF.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has become a versatile and popular method to analyze biological samples. This work presents an overview of theory, instrumentation and applications of MALDI as an analytical tool in biochemistry and molecular biology.

Keywords: MALDI-TOF mass-spectrometry

1. Использование масс-спектрометрии при изучении белков

Масс-спектрометрия представляет собой метод исследования веществ, основанный на измерении отношений масс и заряда ионов. В основе всех существующих масс-спектрометров лежит принцип измерения параметров движения заряженных частиц в электрических и магнитных полях. Фактически это единственно возможный подход для определения молекулярных масс веществ, так как определение массы незаряженных молекул с современной физической точки зрения невозможно. В зависимости от решаемой задачи или предназначения прибора используют подходящий метод ионизации, выбирая тип масс-спектрометра. Масс-спектрометры делятся по типу ионного источника, а для каждого типа источника существует оптимальный тип масс-анализатора (системы разделения ионов по массам). Конструкционно любой масс-спектрометр состоит из трех основных частей – ионного источника, системы разделения ионов и системы регистрации.

Хотелось бы исключить терминологическую неоднозначность. Для регистрации разделенных ионов исторически использовали сцинтилляцию и фосфоресценцию в вакуумной трубке, фотопластинку, а

также измерялся ток, индуцируемый ионами в детекторе. Поэтому, исходя из метода регистрации, использовали термины масс-спектроскопия, масс-спектрография и масс-спектрометрия. Во всех современных приборах осуществляется измерение электрических токов в детекторе, поэтому общеупотребимым и обобщающим стал термин «масс-спектрометрия».

Развитие масс-спектрометрии состояло в совершенствовании и изобретении новых методов получения свободных ионов в вакууме, их разделения и детекции. Заметными вехами стали магнитно-секторный (1940 г., А. Нир) и времяпролетный (1946 г., У. Стивенс) анализаторы. В середине 1950-х годов В. Пол разработал квадрупольный масс-анализатор, а позднее квадрупольную ионную ловушку, специально предназначенную для захвата и измерения масс ионов. Были разработаны масс-спектрометры ионно-циклотронного резонанса (1949, Дж. Хиппл). В начале 1970-х М. Комисароу, А. Маршаллом была разработана новая техника проведения измерений, использующая преобразование Фурье, что на несколько порядков сократило время измерения, появились квадрупольные тандемные масс-спектрометры, разработанные Р. Йоустом и К. Энке (Audi G., 2006; Münzenberg G., 2013). В 2000 году был построен прибор с электростатической орбитальной ионной ловушкой (Makarov A., 2000).

Долгое время единственным методом получения ионов в вакууме являлся метод электронного удара, предложенный А. Демпстером в 1918 году. Этот способ до сих пор широко применяется при исследовании соединений, находящихся в газообразном состоянии или переходящих в него при нагревании в вакууме. Остальные методы ионизации стали появляться лишь во второй половине XX века. Их примерами служат химическая ионизация (предложена в 1966 году В.Л. Тальрозе, Ф. Филдом и М. Мансоном), ионизация при электрораспылении (1968 г., М. Доул), полевая десорбция/ионизация (1969 г., Беки), ионизация бомбардировкой быстрыми атомами (1981 г., М. Барбер), ионизация в индуктивно-связанной плазме (1974 г., В. Фассел, Мак-Фарлайн)(Audi G., 2006; Münzenberg G., 2013).

Однако при использовании этих способов ионизации молекулам сообщается слишком высокая энергия, в случае биополимеров приводящая к их разрушению. Поэтому такие способы практически непригодны для изучения пептидов, белков или нуклеиновых кислот.

В конце 1980-х годов для получения в вакууме свободных ионов достаточно больших лабильных соединений, например, белков, пептидов, полисахаридов или нуклеиновых кислот, было предложено два метода. Первый из них, метод электрораспыления, был предложен Л. Галь в СССР и Д. Фенном в США (получив название ЭРИАД и ESI) (Александров et al., 1984; Yamashita et al., 1984; Fenn et al., 1990). В

основе второго метода лежит открытие группы соединений, большинство из которых представляют собой фенилсодержащие кислоты, которые не только относительно легко (при низких энергиях) образуют ионы в результате лазерной десорбции в вакууме, но и приводят к эффективной ионизации примесных атомов. Этот метод получения ионов получил название MALDI (Karas, Hillenkamp, 1988; Tanaka et al., 1988). С изобретением этих двух методов ионизации появилась возможность точного измерения молекулярных масс белков и пептидов.

2. Масс-спектрометрия MALDI-TOF белков и пептидов

2.1. Устройство масс-спектрометра

Хотя масс-спектрометры могут использоваться и используются для исследования огромного числа разнообразных по природе молекул и соединений, остановимся на анализе только одного вида анализируемых веществ – белков и пептидов.

Любой масс-спектрометр состоит из (1) устройства ввода образца, (2) ионного источника, (3) масс-анализатора, (4) детектора, (5) вакуумной системы и (6) системы управления и обработки данных. Выбор типа каждого элемента системы определяется назначением прибора.

Суть масс-спектрометрического измерения заключается в преобразовании анализируемого вещества в ионы в газовой фазе и измерение отношения массы к заряду (m/z) образованных ионов. Изучение анализируемого вещества в виде газофазного иона определяет две используемые в масс-спектрометре особенности. Первая – движением свободных ионов в вакууме можно управлять с помощью электромагнитных полей, в которых эти ионы находятся, и по характеру этого движения и изменений в движении ионов определять их свойства. Параметры движения зависят от отношения m/z и, в конечном итоге, от молекулярной массы анализируемого вещества.

Вторая особенность заключается в том, что использование газофазных ионов обеспечивает высокую чувствительность масс-спектрометра. С помощью электромагнитных полей можно пространственно локализовать и фокусировать ионы, что позволяет с высокой эффективностью передавать ионы на детектор частиц. Сам детектор работает с высокой чувствительностью, в нем реализованы схемы, аналогичные фотоэлектронному умножителю. На сегодняшний день не существует других технологий столь точного и эффективного манипулирования незаряженными частицами.

Однако необходимость использования газофазных ионов является одновременно основной сложностью в масс-спектрометрии. Именно перевод исследуемых веществ в форму свободных ионов в вакууме без разрушения молекулы есть одна из основных сложностей в масс-спектрометрии, и именно поэтому потребовалось почти сто лет для

разработки методов ионизации биополимеров (англ. Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation) (Karas, Hillenkamp, 1988; Tanaka et al. 1988). При использовании этого метода исследуемое вещество сокристаллизуют в примесных количествах со специально подобранным веществом (англ. matrix), десорбция и ионизация которого происходит при относительно низких энергиях лазерного излучения, так что совместно с основным веществом десорбируется и ионизируется примесное исследуемое соединение, лазерная десорбция которого в чистом виде может происходить только при заметно больших энергиях излучения. Уменьшающие энергию десорбции вещества по аналогии с английским matrix, в значении «вмещающее или содержащее вещество», принято называть матрицами MALDI.

В русскоязычной литературе можно встретить несколько вариантов перевода названия метода, фонетически сходных с английским, но не передающих исходного смысла, в результате чего представляется целесообразным использовать только общеупотребительный акроним «MALDI».

2.2. Образование свободных ионов в MALDI

MALDI является широко используемым аналитическим методом, который появился и развивался главным образом эмпирическим путем. Общепринятого понимания процесса до сих пор не существует, несмотря на достаточно активные исследования в этой области.

Существует большое число предложенных возможных моделей механизмов ионизации MALDI. Практически ни у кого не вызывает сомнений, что процесс ионизации состоит из двух этапов: первый – образование первичных свободных ионов из молекул матрицы, и второй – формирование ионов анализируемого вещества в газовой фазе в результате взаимодействия высокореакционноспособных ионов матрицы и нейтральных молекул анализируемого вещества. Продолжительность первого этапа составляет порядка 4-5 нс и примерно соответствует продолжительности импульса N_2 или Nd:YAG лазера, совпадая со временем жизни возбужденных состояний матрицы. Только в этот промежуток времени могут существовать плотности и потоки энергий, достаточные для формирования газофазных ионов (Dreisewerd 2003; Karas, Krüger, 2003; Setz, Knochenmuss, 2005; Zenobi, Knochenmuss, 1998.). Второй этап, продолжительностью порядка 10 мкс, соответствует периоду адиабатического расширения образовавшихся после лазерного импульса продуктов. В это время происходят ион-молекулярные процессы, ведущие к образованию ионов анализируемых веществ.

Наиболее спорны, или наименее понятны, процессы первого этапа MALDI. Прежде всего, нет общепринятого понимания того, что

происходит раньше – переход матрицы в газовую фазу или образование ионов. Неясно также, ионизируется матрица в момент лазерного воздействия или служит лишь для обеспечения механического выноса с поверхности под действием лазера вещества в виде свободных молекул, атомов или ионов. Этот процесс принято называть лазерной абляцией, если образуется светящаяся плазма, и десорбцией в случае темной плазмы.

Так, существуют модели, предполагающие поведение паров матрицы аналогичным полярной жидкости и рассматривающие дальнейшие процессы так, как это принято в химии растворов. Большинство матриц представляют собой органические кислоты и действительно способны протонировать молекулы анализируемого вещества. При этом, если простая диссоциация недостаточна для образования ионов, то pK , в случае когда электроны находятся в возбужденном состоянии, может значительно, до 10 раз отличаться от pK , когда электроны находятся в стационарном состоянии. В нижние возбужденные состояния электроны могут переходить, поглощая фотоны (Zenobi, Knochenmuss, 1998; Chen et al., 1998).

В большинстве случаев образцы для MALDI приготавливают в водных растворах, часто с добавлением трифторуксусной или муравьиной кислоты. В этих условиях аналиты, по крайней мере, белки и пептиды, оказываются протонированными. Такое состояние может сохраняться после высыхания образца. В одном из экспериментов было показано, что индикаторы (бромфенол, метилоранж и др.) не меняют цвет при высыхании в матрице, что указывает на сохранение электронного состояния (Krüger et al., 2001).

В этом случае в результате абляции образуются кластеры, содержащие нейтральные молекулы, ионы и свободные электроны. Эти частицы большей частью рекомбинируются, и сохранившие заряд ионы составляют лишь малую часть «счастливого выживших» (Karas et al., 2000).

Однако разделение зарядов может происходить и в образующемся при абляции плазменном факеле, при механическом разделении частиц или в результате фотоионизации нейтральных кластеров. Кроме того, можно допустить протекание таких процессов и в тонком слое на поверхности образца под действием лазера.

Предполагается также, что абляция может поддерживаться пневматически: при нагреве поверхности образца в подлежащем слое происходит образование газовых пузырьков, создающих большое давление. Это вполне возможно, учитывая, что матрица разлагается при термическом воздействии (Kinsel et al., 2002; Setz, Knochenmuss, 2005).

Здесь тоже предложено несколько механизмов разделения зарядов: непосредственно в плазме или с поглощением нескольких фотонов и перераспределением заряда. Потенциалы ионизации используемых матриц для отдельных молекул находятся в диапазоне 7-9 эВ (Zenobi,

Knochenmuss, 1998), что соответствует энергии трех фотонов, так как $h\nu$ азотного лазера составляет 3.7 эВ, а третьей гармоники Nd:YAG-лазера – 3.5 эВ. Сомнение вызывает то, что при используемых интенсивностях лазера трехфотонные переходы в одной молекуле маловероятны, впрочем, молекулы матрицы находятся в конденсированной фазе, и коллективные эффекты могут значительно снижать потенциал ионизации, до более вероятных двухфотонных значений. Еще один возможный вариант – ионизация комплексов матрица-аналит. Так, для комплекса дигидроксibenзойной кислоты (DHB) с пролином потенциал ионизации 7 эВ (Kinsel et al., 2002), но при том, что оптимальное для регистрации спектров молярное отношение матрица-аналит составляет порядка 10^3 , можно говорить, что основная энергия излучения поглощается все-таки матрицей.

Так как для используемых в MALDI интенсивностей потока излучения прямое многофотонное возбуждение маловероятно, в последнее время наиболее обсуждаема модель ионизации, которая предполагает однофотонное возбуждение нескольких молекул с переносом энергии. Возбуждение нескольких соседних молекул для интенсивностей в MALDI также маловероятно, но в конденсированной фазе возможна миграция возбуждения двух соседних молекул с возбужденным электронным состоянием в виде экситона с последующей передачей концентрированной энергии. В таком случае возможна даже ионизация, требующая больших значений энергии. Определение зависимости тушения флуоресценции от интенсивности излучения и включения примесей показывает возможность экситонного переноса возбуждения, по крайней мере, в дигидроксibenзойной кислоте (DHB). Экситонная модель делает возможными количественные оценки зависимости эффективности ионизации от интенсивности излучения, которая согласуется с экспериментальными данными (Setz, Knochenmuss, 2005).

Ионы, образованные в условиях высоких плотностей вещества, чтобы стать доступными для масс-спектрометрического анализа, должны перейти в состояния низкой плотности; при этом при расширении образуются вторичные ионы. Перенос заряда может происходить тремя путями – переносом протона, электрона или катиона, но в любом случае такие ионы могут быть зарегистрированы в спектре.

Продукты ион-молекулярных процессов на второй стадии и, как следствие, вид спектра определяются кинетикой и термодинамикой процессов переноса заряда. Для образования вторичных ионов аналита перенос заряда должен быть энергетически выгодным, но если процесс происходит в низких плотностях вещества, основную роль играют кинетические ограничения. То есть, при низких энергиях лазера в спектре сигналы матрицы относительно сильнее.

При анализе пептидов и белков наиболее часто наблюдаются протонированные формы. Сравнение аффинности к протону в газовой фазе матриц (840-907 кДж/моль) и аминокислот показывает, что наиболее кислый, глицин, имеет примерно равное (885 кДж/моль) сродство с матрицами, остальные аминокислоты более основные (955-1025 кДж/моль), и должны легко протонироваться (Cole, 2010). Основания нуклеиновых кислот слабощелочные, и такие образцы больше подходят для анализа в режиме отрицательных ионов. Для этих измерений и матрица подбирается с желательной наибольшей протонной аффинностью, и при достаточных энергиях лазера интенсивности сигналов коррелируют со сродством к протону. При регистрации MALDI-спектров наблюдают также ионы, образованные переносом катионов переходных или щелочных металлов. В случае полимеров эти ионы вводят специально, в других случаях, например, при регистрации спектров нуклеиновых кислот, высокое сродство оснований этих кислот к натрию создает известные трудности.

Третий тип ионов, наблюдаемый прежде всего в спектрах слабо поляризованных молекул, содержащих поляризованные группы, образуется переносом электрона. При регистрации спектров таких веществ в режиме положительных зарядов возможность образования ионов определяется соотношением потенциалов ионизации матрицы и анализируемого вещества и сродством к электрону в случае регистрации отрицательных ионов.

Термодинамика и, отчасти, кинетика переноса заряда определяют другое заметное при регистрации спектров явление – супрессию отдельных ионов. Это могут быть ионы матрицы, такое явление часто можно наблюдать, увеличивая соотношение аналит/матрица в пробе. Более существенной и важной для интерпретации спектров является супрессия образования ионов анализируемых веществ.

Важно отметить, что эффективность образования каждого конкретного иона зависит от состава компонентов исследуемого образца, количества компонентов, количества матрицы в образце и интенсивности импульса лазера. Например, изменение содержания в образце компонента С может существенно изменить эффективности и даже соотношение эффективностей образования ионов A^+ и B^+ . Поэтому по интенсивностям зарегистрированных масс-спектрометром сигналов можно делать только очень приблизительные предварительные количественные оценки, учитывая при этом, что они могут оказаться неверными. Из этого также следует, что различные нормировки сигналов в спектре по суммарной интенсивности или по реперным сигналам могут приводить к ложным результатам.

Таким образом, ионизация MALDI – сложное явление, лежащее в его основе физические и химические явления продолжают интенсивно изучаться.

2.3. Измерение масс ионов

Анализ масс в масс-спектрометре позволяет определить величину m/z ионов анализируемого вещества. При этом массу иона принято выражать в а.е.м., часто используя для этого термин Дальтон, Да, а для больших масс кДа и МДа. Заряд принято выражать в единицах элементарного заряда – e , то есть в зарядах протона или – с обратным знаком – электрона. Величина m/z безразмерная, но иногда используется внесистемная единица – Томсон, $1 \text{ Th} = 1 \text{ а.е.м./}1 e$.

При анализе любого масс-спектра, оперируя величинами массы и m/z , необходимо понимать, что они, вообще говоря, не равны. Прежде всего, наблюдаемый ион может нести несколько элементарных зарядов; такие ионы называют многозарядными. Также необходимо учитывать, каким образом произошло образования иона: присоединением протона, иного катиона, или в результате утраты электрона. Например, пептид с массой 1000 Да, несущий два заряда в виде присоединенных протонов, будет наблюдаться как ион с m/z 501. Из приведенного примера видно, что масса молекулы может быть вычислена из величины m/z молекулярного иона, если известно, как образовался ион и каков его заряд. Кроме молекулярных ионов, часто важным оказывается и определение m/z ионов, образовавшихся в результате фрагментации, что открывает возможность получения структурной информации.

2.4. Изотопия

Молекулярная масса пептида, как и иона, определяется первичной структурой пептида, и эта масса может быть рассчитана из известных масс аминокислотных остатков или содержащихся в молекуле атомов. Однако уже в первых масс-спектрометрических экспериментах было обнаружено, что химически неразличимые атомы имеют несколько различных массовых чисел. Точно так же, составляющие молекулу атомы одного и того же элемента будут иметь различные массы. Примерно 1.1% углерода в природе представляет собой изотоп ^{13}C , 4.2% серы – изотоп ^{34}S , азот водорода и кислорода также имеют стабильные изотопы. Поэтому в состав любого пептида или белка с некоторой вероятностью включены изотопы ^{13}C , ^{34}S и др., а это приводит к появлению нескольких различных масс одного и того же пептида. Вероятность включения в пептид ^{13}C и ^{34}S растет с увеличением общего числа атомов углерода и серы в его составе. В пептиде массой около 1000 Да содержится примерно 50 атомов углерода (в природном распределении доля стабильных изотопов других элементов крайне мала, и основной вклад

вносит именно углерод). Расчет вероятности содержания в молекуле ^{13}C показывает, что примерно 50 % молекул будет содержать только ^{12}C , 30% будет содержать один атом ^{13}C , 10% – два, некоторые молекулы, хотя их количество окажется незначительным, будут содержать три и более атомов ^{13}C . Легко видеть, что при увеличении размера пептида увеличится и число атомов углерода в его составе, а в результате доли молекул пептида, содержащих один, два и более изотопов ^{13}C . При массах пептида 8-10 кДа число молекул, не содержащих ни одного ^{13}C , составляет менее 1% от общего числа. Многие современные масс-спектрометры работают с разрешением, достаточным для того, чтобы различить молекулы пептида, включающие разное число изотопов ^{13}C . Каждый пептид в спектрах, полученных на таких приборах, представлен несколькими пиками – изотопным пакетом. Для удобства обработки и описания введено понятие «моноизотопная масса» – масса молекул, имеющих в составе только самые легкие изотопы элементов: ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O и ^{32}S .

Иногда в спектре не удается разрешить изотопные сигналы, в этом случае измеряется средняя масса. Если в эксперименте не использованы изотопные обогащения, она будет соответствовать молекулярной массе, вычисленной способом, обычно применяемым при стехиометрических расчётах, с использованием представленных в периодической таблице Д. И. Менделеева «средних атомных масс» или «стандартных атомных масс», являющихся средневзвешенными всех стабильных изотопов соответствующего химического элемента с учётом природной распространённости в земной коре и атмосфере.

Важно не путать моноизотопную и среднюю массы, так как они весьма значительно различаются. Например, для пептида массой 1000 Да разница составляет примерно 0,7 Да, а для пептида массой 5000 Да - уже 3 Да.

2.5. Времяпролетный масс-анализатор

Измерение m/z осуществляется в масс-анализаторе. Разработано и используется большое число различных типов таких устройств, их выбор определяется методом получения ионов и поставленными задачами.

Ионный источник MALDI работает в импульсном режиме; для источников такого типа наиболее целесообразным является времяпролетный масс-анализатор.

Принцип действия этого анализатора достаточно прост для понимания. Разделяемые ионы ускоряют в электрическом поле, где они получают одинаковую кинетическую энергию. Обычно используется ускоряющее напряжение от 20 до 30 кВ. Получив ускорение, ионы продолжают дрейф в бесполом пространстве со скоростью, обратно пропорциональной массе иона.

Движение ионов во времяпролетном анализаторе описывается формулой

$$mv^2/2=ezU \quad (1)$$

где e – единичный заряд электрона, U – напряжение, а m , z и v – масса, число зарядов и скорость иона, соответственно.

Из-за этой обратной пропорциональности массы и скорости ионы с меньшим m/z двигаются быстрее ионов с большим m/z . Принято говорить, что ионы дрейфуют, при этом скорости движения ионов составляют сотни м/с. Время, необходимое иону на дрейф в бесполевым пространстве, измеряется и используется для вычисления скорости, а в конечном счете – m/z иона.

Легко видеть, что

$$v = (ezUz/m)^{1/2}$$

или

$$v \sim (z/m)^{1/2}$$

Сильно упрощенная схема времяпролетного масс-спектрометра представлена на Рис. 1.

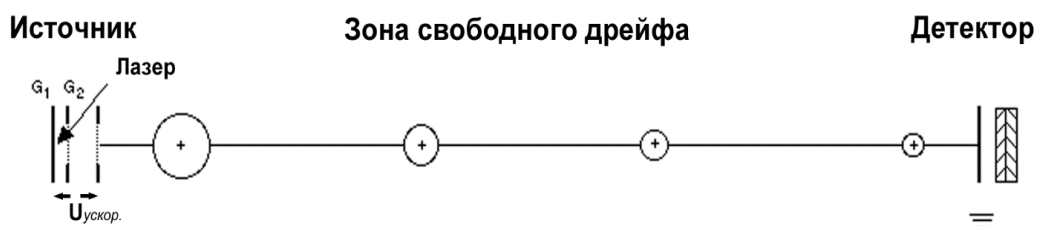


Рис. 1. Упрощенная схема времяпролетного масс-спектрометра

2.6. Основные параметры масс-анализаторов

Основной характеристикой масс-анализатора является разрешение. В масс-спектрометрии разрешение (R) принято определять как отношение измеряемой массы к ширине пика на половине высоты пика:

$$R = (m/z)/(\Delta m/z)$$

Таким образом, чем больше разрешение, тем уже пики сигналов и лучше разделение ионов с близкими по величине m/z сигналами. Также увеличивается и точность определения m/z , поскольку улучшается точность определения центра моноизотопного пика. Обычно достаточным считается разрешение, позволяющее различать изотопные кластеры. Если разрешение недостаточно, то, как уже отмечалось, вместо изотопного пакета в спектре наблюдаются единичные пики каждого пептида.

Следствием высокого разрешения является и высокая точность измерения массы иона. При моноизотопном разрешении она может

достигать 0.01 Да или менее. Разрешение моноизотопных сигналов позволяет также определить заряд иона, а значит, установить его молекулярную массу.

Как и любое измерение, определение m/z характеризуется точностью, то есть отличием измеренного значения от истинного, и воспроизводимостью. В протеомных исследованиях точность может быть определена из сравнения измеренных значений с теоретически полученными, например, вычисленными из геномных данных массами пептидов.

В идеальных условиях разрешение масс-спектрометров MALDI-TOF в диапазоне 100-5000 Да составляет не менее 20000. При этом точность может быть не менее 5-20 миллионных долей (м.д. или ppm). Под идеальностью условий надо понимать хорошо подготовленный для исследований и имеющийся в достаточном количестве образец. Получаемые в реальном эксперименте точность и воспроизводимость разрешения могут быть несколько или заметно хуже.

Получить указанные характеристики спектров удастся благодаря особенностям конструкции приборов, прежде всего за счет наличия системы задержки экстракции и отражателя – рефлектрона (см. ниже).

2.7. Улучшение характеристик времяпролетного анализатора

Наиболее значимо на разрешение прибора влияют особенности процесса ионизации. Прежде всего, этот процесс длится некоторое, не меньшее продолжительности лазерного импульса, конечное время. В результате ионы одного m/z прилетают в детектор не одновременно, расширяя получаемый сигнал. Еще больше на разрешение влияет то, что образующиеся ионы изначально имеют некоторые скорости, отличающиеся по величине и направлению, и этот разброс скоростей сохраняется при действии ускоряющего напряжения.

Влияние начального разброса скоростей удастся минимизировать, используя высокие ускоряющие напряжения и большую длину зоны дрейфа ионов: чем длиннее труба масс-спектрометра, тем выше разрешение прибора. Действительно, более длинная труба означает большее время дрейфа, а значит, относительный вклад разброса времени образования иона и скоростей уменьшается. Аналогично, большее ускоряющее напряжение сообщает ионам большую кинетическую энергию, и вклад исходной кинетической энергии (разброс скоростей) становится относительно меньше.

Чтобы еще больше уменьшить влияние на разрешение моментов образования ионов и стартового разброса их скоростей используется специальная схема ускорения ионов – с задержкой экстракции. Ускоряющее поле не постоянно, некоторое время оно экранируется запирающим напряжением, и за это время ионы отчасти выравниваются

по энергиям за счет столкновений; одновременно с этим ионы дрейфуют в область, в которой с задержкой будет создано ускоряющее поле, и ионы с большей кинетической энергией входят в эту область на большую глубину. В результате после включения поля ионы с большей кинетической энергией ускоряются меньшим ускоряющим напряжением. Время задержки экстракции составляет до 50-200 нс и подбирается в зависимости от исследуемого диапазона масс (Brown, Lennon, 1995; Guilhaus, 1995).

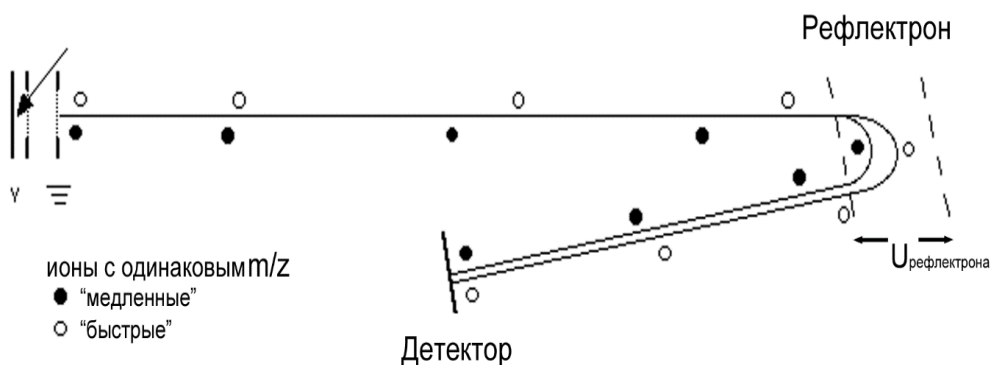


Рис. 2. Фокусировка ионов в рефлектроне.

Еще один, пожалуй, самый эффективный, способ уменьшения влияния разброса начальных кинетических энергий ионов — использование ионного отражателя, или рефлектрона Мамырина. В конце времяпролетной трубы под небольшим углом к направлению дрейфа ионов системой электродов создается область электрического поля с разностью потенциалов, несколько превышающей ускоряющее напряжение в источнике ионов. Достигая этой области, собственно рефлектрона, ионы тормозятся, а затем ускоряются в обратном направлении. После этого они продолжают дрейф в направлении детектора, расположенного в районе ионного источника (Рис. 2). Частицы, слегка различающиеся по энергии, тратят разное время на разворот: имеющие большую энергию пролетают дальше в поле рефлектрона и проходят больший путь разворота, меньшую энергию — меньший путь. Напряжение подбирают так, чтобы они оказались сфокусированы на детекторе (Каратаев и др., 1971; Мамырин и др., 1973).

2.8. Фрагментация пептидов в MALDI

Образующиеся в MALDI ионы пептидов могут получить и, как можно судить по спектрам, получают энергию, достаточную для фрагментации или распада на отдельные части молекул. Механизм

получения ионами избыточной энергии не вполне ясен. Оценивая энергии, необходимые для фрагментации, можно предположить, что получается она в результате столкновений ионов с нейтральными молекулами в процессе лазерной десорбции. По стабильности ионы могут быть разделены на три класса: (I) стабильные ионы, не обладающие достаточной для фрагментации внутренней энергией; (II) нестабильные ионы, получившие энергию, достаточную для немедленной фрагментации; и (III) метастабильные ионы, обладающие промежуточным по величине избытком внутренней энергии (Paizs, Suhai, 2004). В случае масс-спектрометрии MALDI белков и пептидов встречаются оба типа способных к фрагментации ионов. Нестабильные, распадающиеся в источнике ионы (ISD, in source decay, англ.), регистрируются в обычных условиях регистрации, так как фрагменты образуются до ускорения частиц, и ведут себя как ионы соответствующей массы. Метастабильные образуют фрагменты после действия ускоряющего напряжения, в период свободного дрейфа (PSD post source decay, англ.), и в случае линейного анализатора все фрагменты распада ионов определенной массы достигают детектора одновременно со стабильными ионами той же массы. В случае использования системы разделения с рефлектроном, фрагменты метастабильных ионов, обладая меньшей кинетической энергией, быстрее покидают поле рефлектрона и регистрируются как сигналы ионов с массой меньше родительской, при этом не соответствующей своей действительной массе и имеющие характерное увеличение ширины сигнала, либо достигают детектора до начала регистрации спектра и в спектр не попадают. Вероятность путей фрагментации определяется только энергией и структурой каждого отдельно взятого иона (Paizs, Suhai, 2004; Eckersall et al., 2012).

Пептиды являются сложными молекулами, состоящими из тысяч атомов (в случае белков размеры и количество атомов пропорционально возрастают), поэтому количество возможных путей фрагментации практически не ограничено. Однако вероятность того или иного варианта зависит от внутренней энергии и скорости конкретной реакции. В случае пептидов это выражается в более вероятных разрывах связей вдоль скелета молекулы с образованием характерных дочерних ионов. Так как при регистрации спектра учитываются сигналы большого числа ионов (10^5 - 10^8 штук), на итоговом спектре наблюдаются сигналы, образованные от однократных разрывов по различным связям.

В зависимости от того, какая связь разрывается, и на какой части молекулы сохраняется заряд (на N- или C-конце), была предложена номенклатура (Roepstorff, Fohlman, 1984; Johnson et al., 1987), выделяющая следующие серии ионов: фрагменты, в которых заряд сохраняется на C-концевой части молекулы, обозначаются как x, y и z, на N-концевой части исходной молекулы, – символами a, b и c (Рис. 3)

(Johnson et al., 1987). Часто встречается характерный внутренний фрагмент – ион иминия.

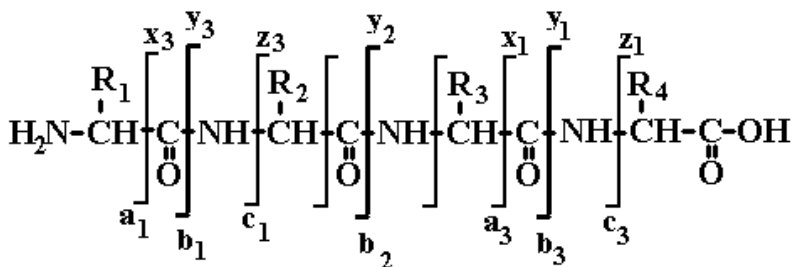


Рис. 3. Номенклатура ионов фрагментации пептидов в зависимости от точки разрыва и локализации заряда.

Таким образом, спектры фрагментации оказываются весьма информативными для определения внутренней структуры или секвенирования пептидов. Как указано выше, фрагменты распада ISD легко регистрируются с корректными массами в обычном режиме масс-спектрометра. Для регистрации PSD были разработаны специальные tandemные масс-спектрометры (Suckau et al., 2003). Количество подверженных PSD распаду метастабильных молекул относительно невелико. Чтобы получить более интенсивные сигналы, создаются условия, индуцирующие распад молекул (Sleno, Volmer, 2004). Конструкцией современных MALDI масс-спектрометров предусмотрен напуск газа, обычно аргона, столкновение с молекулами которого увеличивает энергию и интенсивность фрагментации исследуемых ионов. Это третий тип фрагментации в MALDI – высокоэнергетичная столкновительная диссоциация (HECID, HighEnergyCID, hCID или keVCID) (Domingues et al., 1999; Nikolaev et al., 2001).

Тип фрагментации определяют величина избыточной энергии и время перераспределения возбуждения внутри молекулы, от которых зависят предпочтительные пути фрагментации. Замечено, что аффинность к протону образующих связь атомов коррелирует с вероятностью ее разрыва. Кислотные группы боковых цепей аминокислот могут стабилизировать положительный заряд, поэтому разрывы пептидной связи рядом с остатком глутаминовой и аспарагиновой кислоты обычно приводят к наиболее интенсивным пикам в спектре. Эти наблюдения лежат в основе объяснения фрагментации гипотезой подвижного протона (Wysocki et al., 2000). Часто повышенной интенсивностью обладают пики ионов, образовавшихся в результате разрыва амидных связей в центральной части молекулы (Paizs, Suhai, 2004). Вторичная структура пептида также оказывает влияние на получаемые спектры.

Некоторые боковые группы аминокислот отвечают за специфические направления фрагментации, не связанные с разрывом пептидных связей. В частности, серин и треонин, содержащие гидроксильные группы в боковых цепях, легко отщепляют молекулу воды.

Для интерпретации спектров фрагментации полезно знать, что в условиях MALDI в результате ионизации в источнике образуются преимущественно с- и z-ионы, а в случае достаточно низких энергий psd основные типы образующихся ионов – b- и y-ионы (Рис. 3). В зависимости от наиболее выгодной локализации протона на исходном ионе, в спектре будут преобладать пики b- или y-серии (Wysocki et al., 2000). Если в N-концевой части молекулы находятся аргинин или лизин, в масс-спектре будут доминировать пики ионов серии b-. Если эти аминокислоты замыкают C-конец пептида, наиболее интенсивными будут пики ионов серии y-. В случае активации фрагментации CID, помимо серий b- и y-ионов в спектрах присутствуют a-/x-, c-/z- ионы, а также ионы, образовавшиеся в результате утраты части боковых групп и внутренние ионы, такие как ионы иминия (Paizs, Suhai, 2004; Domingues et al., 1999; Nikolaev et al., 2001).

2.9. Измерение m/z фрагментов

Как уже отмечено, в условиях MALDI образуются фрагментные ионы, по крайней мере, трех типов (Paizs, Suhai, 2004).

Ионы, образовавшиеся в источнике, регистрируются так же, как и ионы целых молекул. Однако чтобы измерить m/z фрагментов, образовавшихся после того, как ионы покинули источник, а также индуцировать образование таких ионов методами HE CID, масс-спектрометры оснащаются дополнительным оборудованием и работают в особом режиме (Medzihradsky et al., 2000). Прежде всего, увеличивается мощность лазера для обеспечения большего количества исходных ионов. Ускоряющее напряжение уменьшается до величины примерно 8 кВ. Это увеличивает время дрейфа ионов и временной интервал, в котором может происходить фрагментация.

Чтобы получить фрагменты, образующиеся в результате HE CID, осуществляется напуск газа, увеличивающего частоту столкновений, обычно аргона. Как правило, анализируемое вещество представляет собой смесь, но фрагменты распада конкретного родительского иона дрейфуют вместе. Это позволяет решить задачу выделения группы таких ионов селектором родительских ионов – группой электродов, на которые подается отклоняющее напряжение, отключаемое только на короткий промежуток пролета конкретного иона и его фрагментов.

Следующая группа электродов дополнительно ускоряет выбранные фрагменты ускоряющим напряжением примерно 19 кВ. При этом более легкие фрагменты приобретают большую скорость, более тяжелые –

меньшую, а последними вылетают нераспавшиеся родительские ионы. Фрагменты свободно достигают рефлектора, который изменяет направление движения частиц и направляет их в детектор.

Не подвергшиеся фрагментации родительские ионы, последними покидающие зону дополнительного ускорения, как правило, удаляются из пакета, они отклоняются напряжением, кратковременно подающимся на третью группу электродов – фильтр родительских ионов. Это делается, чтобы избежать засорения спектра фрагментации паразитными неидентифицируемыми сигналами продуктов распада метастабильных родительских ионов (Suckauet al., 2003).

2.10. Детектор времяпролетного анализатора

Для регистрации времени пролета ионов используют детектор на микроканальных пластинах. Последние обычно представляют собой диск толщиной 2 мм, пронизанный расположенными под небольшим, примерно 8°, отклонением от перпендикуляра к плоскости параллельными каналами диаметром 6-10 мкм.

Как правило, детектор представляет собой две находящиеся в электрическом поле пластины, повернутые в плоскости на 90° так, чтобы каналы обеих пластин оказались под углом друг к другу. Каждый микроканал действует как вторично-электронный умножитель. Ускоренные частицы сталкиваются со стенками микроканалов, вызывая эмиссию одного или нескольких электронов, ускорение и повторную эмиссию электронов. В результате такого каскада ток на аноде детектора усиливается на несколько порядков величины.

Зависимость тока в детекторе от времени образует масс-спектр, регистрируемый на времяпролетном масс-спектрометре. Типичные интервалы между моментом импульса лазера и моментом возникновения тока в детекторе составляют от 1 до 100 мкс, поэтому в масс-спектрометрах используются цифроаналоговые преобразователи с частотой дискретизации от 2 до 4 ГГц.

Как видно из формулы (1) зависимость между m/z и временем t – квадратичная. Это значит, что определив времена пролета трех известных ионов, можно построить численную зависимость для вычисления m/z неизвестных ионов.

3. Масс-спектрометрия в биологии и медицине

Первой задачей при изучении белка, как правило, является его идентификация, или при современном развитии биохимии, определение гена, с которого он считывается. Идентификация белка по его молекулярной массе в большинстве случаев невозможна из-за недостаточной точности измерения массы молекул, более тяжелых, чем

10 кДа, но также и из-за посттрансляционных модификаций. Для идентификации белка на практике используют масс-спектрометрические пептидные карты (в англоязычных публикациях PMF – peptide mass fingerprint), которые представляют собой набор значений масс пептидов после специфического гидролиза – химического, но чаще всего ферментативного (O'Farrell, 1975; Jensen et al., 1999).

В качестве специфичной протеазы обычно используется самая доступная из известных протеаз – трипсин, фермент с высокой активностью, высокой специфичностью и стабильностью. После гидролиза проводят регистрацию масс-спектра полученной смеси продуктов реакции и поиск по базам данных. В базы данных входят последовательности известных белков, транслированные гены экспрессируемых последовательностей (EST), по которым предсказывают молекулярные массы триптических пептидов. Из них определяются кандидаты, наиболее близкие к пикам масс-спектра, полученным в эксперименте (Mann et al.1993; Pappin et al.1993; Shevchenko et al., 1996; Perkins et al., 1999). Чаще всего для поиска используют наиболее обширную базу белков и генов Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), или наиболее полно аннотированную базу белков, поддерживаемую международным консорциумом UniProt (SWISS-Prot-UniProt).

При этом наблюдается неполное соответствие расчётных и экспериментальных наборов пептидных масс, которое объясняется неспособностью некоторых пептидов к ионизации, стерическими ограничениями при гидролизе или особенностями специфичности протеаз, а также природными и инструментальными модификациями белков и пептидов.

Как правило, идентификация белка с использованием пептидных карт возможна только в случае индивидуального белка или несложных смесей из двух-трех, редко четырех белков. Самыми эффективными способами разделения являются одномерный или двумерный, по О'Фареллу (O'Farrell, 1975), электрофорез в геле. Гидролиз выделенного белка чаще всего проводят непосредственно в геле, после чего пептидные продукты легко экстрагируются и используются для масс-спектрометрического анализа. Для такого анализа достаточно нескольких кубических миллиметров геля, содержащего около 20-100 нг белка (Jensen et al., 1999).

Поставляемые в последние годы масс-спектрометры позволяют не только измерять молекулярные массы целых ионов пептидов, но и получать спектры (их часто называют тандемными) фрагментов отдельных пептидов в сложных смесях, например, в смесях продуктов гидролиза белков. Такие спектры иногда позволяют расшифровать неизвестную аминокислотную последовательность пептида. Если это

невозможно, например, в случае неполной фрагментации конкретного пептида, полученный спектр фрагментации можно использовать для поиска в базах данных пептида, который мог бы иметь спектр фрагментации, аналогичный экспериментальному. Наличие спектров фрагментации двух и более пептидов одного белка позволяет идентифицировать белок с высокой достоверностью. Это дает возможность проведения высокопроизводительного анализа сложных смесей белков путем проведения на первом этапе гидролиза смеси без предварительного разделения компонентов, с последующим разделением продуктов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрическим анализом и идентификацией белков по спектрам фрагментации пептидов.

Развитие методов высокопроизводительного и достаточно дешевого анализа белков с использованием масс-спектрометрии дало возможность проведения исследования составов, структур, модификации и назначения всех белков организма или его отдельных тканей. Для обозначения таких подходов и методов по аналогии с геномикой и геномом в 90-х годы XX века Марк Уилкинс ввел термины «протеомика» и «протеом». В отличие от классической белковой химии, протеомные подходы дают возможность изучать сложные смеси белков, белковые системы как единое целое.

Иногда описание различий в системах белков в виде изменений конкретных идентифицированных белков недостаточно информативно. Однако если такие изменения есть, они могут быть обнаружены, и в том числе с помощью масс-спектрометрического анализа. В этом случае различия или изменения в системе будут выражаться в наличии, отсутствии или изменении интенсивности определенных сигналов (пики). Совокупности масс-спектрометрических сигналов, отражающие различные состояния образцов, образуют профили этих образцов. Существуют методы анализа, основанные на сравнении и классификации полученных профилей.

Наиболее привлекательными в плане скорости и производительности выглядят варианты изучения биологического образца без какой либо обработки, путем непосредственного внесения его в масс-спектрометр, регистрации спектров, построения профилей, обработки посредством классификаторов или создания баз данных профилей состояний. Такие подходы действительно разработаны и показали хорошие результаты при классификации клинических изолятов, штаммов и популяций микроорганизмов. При этом регистрировались MALDI масс-спектры целых бактериальных клеток (Pina et al., 2009). Существуют работы, в которых проводился масс-спектрометрический анализ физиологических жидкостей и срезов тканей животных и человека, однако подобного рода

анализ более сложных объектов вызывает существенные затруднения, а его информативность не всегда достаточна (Koomen et al., 2005).

Список литературы

Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Шкуров В.А. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении – новый метод масс-спектрометрического анализа // ДАН СССР. 1984. Т. 277. № 2. С. 379–383.

Каратаев В.И., Мамырин Б.А., Шмикк Д.В. Новый принцип фокусировки ионных пакетов во времяпролетных масс-спектрометрах //ЖТФ. 1971. Т. 41. Вып. 7. С. 1498–1501.

Мамырин Б.А., Каратаев В.И., Шмикк Д.В., Загулин В.А. Массрефлектор, новый безмагнитный времяпролетный массспектрометр с высоким разрешением // ЖТФ. 1973. Т. 64. Вып. 1. С. 82–89.

Audi G. The history of nuclidic masses and of their evaluation // Int. J. Mass Spectrom. 2006. V. 251. № 2-3. P. 85–94.

Brown R.S., Lennon J.J. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer // Anal. Chem. 1995. V. 67. № 13. P. 1998–2003.

Cole R.B. Electrospray and MALDI mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

Chen X., Carroll J.A., Beavis R.C. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998. V. 9. № 9. P. 885–891.

Dreisewerd K. The desorption process in MALDI // Chem. Rev. ACS Publications. 2003. V. 103. № 2. P. 395–426.

Domingues M.R., S-Marques M.G., Vale C.A., Neves M.G., Cavaleiro J.A., Ferrer-Correia A.J., Nemirovskiy O.V., Gross M.L. Do charge-remote fragmentations occur under matrix-assisted laser desorption ionization post-source decompositions and matrix-assisted laser desorption ionization collisionally activated decompositions? // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999. V. 10. № 3. P. 217–223.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. Electrospray ionization – principles and practice // Mass Spectrom. Rev. 1990. Vol. 9, № 1. P. 37–70.

Guilhaus M. Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts // J. Mass Spectrom. 1995. Vol. 30, № 11. P. 1519–1532.

Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C., Chait B.T. Matrix-assisted laser desorption /ionization mass spectrometry of biopolymers // Anal. Chem. 1991. V. 63. № 24. P. 1193A–1203A.

Irina E.N., Borovskaya A.D., Malakhova M.M., Vereshchagin V.A., Kubanova A.A., Kruglov A.N., Svistunova T.S., Gazarian A.O., Maier T., Kostrzewa M., Govorun V.M. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria* // J. Mol. Diagnostics. 2009. V. 11. № 1. P. 75–86.

Jensen O.N., Wilm M., Shevchenko A., Mann M. Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels // *Methods Mol. Biol.* 1999. V. 112. P. 513–530.

Johnson R.S., Martin S.A., Biemann K., Stults J.T., Watson J.T. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. № 21. P. 2621–2625.

Karas M., Glückmann M., Schäfer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors // *J. Mass Spectrom.* 2000. V. 35. № 1. P. 1–12.

Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. № 20. P. 2299–2301.

Karas M., Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism // *Chem. Rev.* 2003. V. 103. № 2. P. 427–440.

Kinsel G.R., Knochenmuss R., Setz P., Land C.M., Goh S.K., Archibong E.F., Hardesty J.H., Marynick D.S. Ionization energy reductions in small 2,5-dihydroxybenzoic acid-proline clusters. // *J. Mass Spectrom.* 2002. V. 37. № 11. P. 1131–1140.

Koomen J.M., Shih L.N., Coombes K.R., Li D., Xiao L., Fidler I.J., Abbruzzese J.L., Kobayashi R. Plasma protein profiling for diagnosis of pancreatic cancer reveals the presence of host response proteins // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 3. P. 1110–1118.

Krüger R., Pfenninger A., Fournier I., Gluckmann M., Karas M. Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 24. P. 5812–5821.

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 6. P. 1156–1162.

Mann M., Højrup P., Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases // *Biol. Mass Spectrom.* 1993. V. 22. № 6. P. 338–345.

Medzihradszky K.F., Campbell J.M., Baldwin M.A., Falick A.M., Juhasz P., Vestal M.L., Burlingame A.L. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 3. P. 552–558.

Münzenberg G. Development of mass spectrometers from Thomson and Aston to present // *Int. J. Mass Spectrom.* 2013.

Nikolaev E.N., Somogyi Á., Smith D.L., Gu C., Wysocki V.H., Martin C.D., Samuelson G.L. Implementation of low-energy surface-induced dissociation (eV SID) and high-energy collision-induced dissociation (keV CID) in a linear sector-TOF hybrid tandem mass spectrometer // *Int. J. Mass Spectrom.* 2001. V. 212. № 1. P. 535–551.

O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 10. P. 4007–4021.

Paizs B., Suhai S. Fragmentation pathways of protonated peptides // *Mass Spectrom. Rev.* 2004. V. 24. № 4. P. 508–548.

Pappin D.J., Højrup P., Bleasby A.J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting // *Curr. Biol.* 1993. V. 3. № 6. P. 327–332.

Perkins D.N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // Electrophoresis. 1999. V. 20. № 18. P. 3551–3567.

Roepstorff P., Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides // Biomed. Mass Spectrom. 1984. V. 11. № 11. P. 601.

Setz P.D., Knochenmuss R. Exciton mobility and trapping in a MALDI matrix // J. Phys. Chem. A. 2005. V. 109. № 18. P. 4030–4037.

Shevchenko A., Jensen O N., Podtelejnikov A V., Sagliocco F., Wilm M., Vorm O., Mortensen P., Boucherie H., Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels // Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 1996. V. 93. № 25. P. 14440–14445.

Sleno L., Volmer D.A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2004. V. 39. № 10. P. 1091–1112.

Suckau D., Resemann A., Schuerenberg M., Hufnagel P., Franzen J., Holle A.A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 376. № 7. P. 952–965.

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988. V. 2. № 8. P. 151–153.

Wysocki V.H., Tsaprailis G., Smith L.L., Brexi L.A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation // J. Mass Spectrom. 2000. V. 35. № 12. P. 1399–1406.

Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme // J. Phys. Chem. 1984. V. 88. № 20. P. 4451–4459.

Zenobi R., Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry // Mass Spectrom. Rev. 1998. V. 17. № 5. P. 337–366.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ГРИБОВ

Алёшин В.В.¹, Михайлов К.В.¹, Карпов С.А.^{2,3}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова
119991 г. Москва, Ленинские горы, д. 1 стр. 40
E-mail: Aleshin@genebee.msu.su

²Зоологический институт Российской академии наук
199034 г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д.1

³Санкт-Петербургский государственный университет
199034 г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

Рассматриваются начальные этапы эволюции грибов, восстановленные на основании филогенетических реконструкций. Обсуждается возможная роль предковых форм грибов в выходе растений на сушу и образовании почв.

Ключевые слова: эволюция грибов, филогенетические реконструкции

Initial stages of fungi evolution revealed by phylogenetic reconstructions are considered. Possible role of ancestral fungi taxons in colonization of land by plants and soil formation is discussed.

Keywords: fungi evolution, phylogenetic reconstructions

На суше, в пресных водах и морях многочисленные виды грибов и бактерий вовлечены в редуцию органических остатков. Но всегда ли состав редуцентов был такой как сейчас, или он менялся в эволюционной истории Земли? Большинство современных грибов – это обитатели почвы или паразиты или симбионты высших растений. Происхождение грибов логично связывать с наземными сообществами. Но высшая наземная растительность на Земле была не всегда. В настоящее время различные субстраты на суше, в том числе лишенные почвы, заселяются одноклеточными водорослями как в гумидных, так и аридных зонах. Нет оснований отрицать такую способность водорослей и в давние времена – до появления высших растений. Производимую наземными водорослями органику потребляют их внутриклеточные паразиты: афелиды и розеллиды (криптомикоты) (Карпов et al., 2014). На филогенетическом дереве они образуют раннюю ветвь Holomycota, сестринскую грибам (Карпов et al., 2013; Letcher et al., 2013). Высокая достоверность филогенетических реконструкций, позволяющая утверждать именно такой характер родства, обусловлена развитием компьютерных

технологий (совершенствованием алгоритмов построения филогенетических деревьев, возможностью проводить параллельные вычисления с использованием суперкомпьютеров) и масштабным геномным секвенированием. Сестринские отношения грибов и клады, объединяющей афелид с криптомикотами, подтверждаются филогенетическим анализом большого числа генов. В этом анализе лучше всего зарекомендовал себя байесов подход с использованием моделей молекулярной эволюции, параметры которых подбираются в испытаниях Монте-Карло с использованием Марковских цепей. Опираясь на высокую апостериорную вероятность филогенетических реконструкций, можно с высокой достоверностью делать заключения об организации ближайшего общего предка грибов, розеллид и афелид.

Афелиды и розеллиды являются протистами, недалеко по внешнему виду и способу питания ушедшими от амёб нуклеарий, и сохраняют образ жизни предков грибов. Для расселения зооспор они нуждаются в капельно-жидкой влаге, подобно низшим хитридиевым грибам, среди которых также многие виды являются паразитами одноклеточных водорослей, а среди оставшихся преобладают сапротрофы, ориентированные на мелкодисперсную органику. Разнообразие хитридиевых наиболее высоко в высокогорных ландшафтах (Freeman et al., 2009) – ближайших современных аналогах древней суши до появления почв и зарегулированного стока. Деятельность пионерных наземных сообществ, состоявших из одноклеточных водорослей и их консументов (афелид, розеллид, а впоследствии и хитридиевых), способствовала накоплению на суше органики (палеопочв) и подготавливала выход на сушу предков высших растений, который, как теперь принято считать, происходил в составе комплексов (арбускулярной микоризы) растений с грибами (James et al., 2006). Например, таксон высокого ранга грибов с несептированным мицелием, гломеромикоты, представлен почти исключительно лишайниковыми или паразитическими формами. Многоклеточные тела высших растений (живых или мертвых) – это долговременные субстраты, способные поддерживать внутри себя длительное существование и развитие высших мицелиальных грибов. История грибов, начавшись с паразитов одноклеточных водорослей, через лишайнико- и микоризообразователей привела к выходу на сушу высших растений, появлению больших запасов органики, преобразование которых мицелиальными грибами (при участии других микроорганизмов) привело к образованию почв, регулированию стока и в конце концов формированию современного облика Земли.

Список литературы

Freeman K.R. et al. Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 18315–18320.

James T.Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny // *Nature*. 2006. V. 443. P. 818–822.

Karpov S.A. et al. Obligately phagotrophic aphelids turned out to branch with the earliest-diverging fungi // *Protist*. 2013. V. 164. № 2. P. 195–205.

Karpov S.A. et al. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Article 112.

Letcher P.M. et al. Characterization of *Amoeboaphelidium protococcarum*, an algal parasite new to the cryptomycota isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. № 2: e56232.

ПЕРСПЕКТИВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В МИКРОБНОЙ ЭКОЛОГИИ

Н.Л. Белькова

*Лимнологический институт СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
Иркутский государственный университет
664003 г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1
E-mail: nlbelkova@gmail.com*

Обсуждаются современные возможности молекулярно-биологических методов для изучения разнообразия, структуры и функциональной активности микробных сообществ.

Ключевые слова: таксономия бактерий, молекулярные методы, ПЦР, РВ-ПЦР, метагеномика, функциональная активность микробного сообщества

The modern use of methods of molecular biology for the study of diversity, structure and functional activity of microbial community is discussed.

Key words: bacterial taxonomy, molecular methods, PCR, RT-PCR, metagenomics, functional activity of microbial community

Молекулярно-генетические подходы произвели революцию в микробиологии в 90-е годы XX века и по мере совершенствования технологической и реагентной базы усиливают свое влияние в разных областях микробиологических исследований. На самом первом этапе их активное использование в микробной экологии основывалось на применении полимеразной цепной реакции и последующего анализа ампликонов с помощью клонирования (Lane et al., 1985; Stahl et al., 1985; Amann et al., 1995 и др.) или денатурирующего градиентного гель-электрофореза (Muyzer et al., 1995; Ferris et al., 1996 и др.). Эти исследования выявили огромное разнообразие микроорганизмов, множество некультивируемых групп и открыли широкие возможности для изучения бактерий без культивирования, непосредственно в природном образце (Amann et al., 1995; Theron, Cloete, 2000; Pernthaler, Amann, 2005; Lewis et al., 2010 и др.). Благодаря этим работам к концу XX века в таких направлениях как культивирование и таксономия бактерий исследователи сформулировали целый спектр новых целей и задач, в основном отвечающих на вопросы «кто?» и «где?». Постепенно были выделены целые кластеры нуклеотидных последовательностей,

характерных для представителей самых разнообразных микробных сообществ. Были предприняты успешные попытки подбора селективных условий для культивирования конкретных микроорганизмов и подтверждено существование новых таксономических линий. Прогресс, который происходит в классической микробиологии, очевиден, а концепция «некультивируемости» некоторых бактериальных групп разрушается по мере развития методических подходов, реагентной и инструментальной базы (Duetz, 2007; Alain, Querellou, 2009 и др.). Например, одна из самых распространенных гетеротрофных бактерий на планете – *Pelagibacter ubique* SAR-11 – была успешно культивирована и изолирована с использованием морской воды с низкой концентрацией фосфора и аммония (Rappe et al., 2002). Первый мезофильный представитель кренархеот – *Nitrosopumilus maritimus*, также повсеместно распространенный по всему миру, удалось выделить в культуру последовательным разведением накопительных культур, выращенных на фильтрованной морской воде с добавлением хлорида аммония (Köppe et al., 2005). Таким образом, молекулярная микробиология сначала поставила под сомнение уверенность микробиологов начала прошлого века в том, что культивируемые на селективных питательных средах микроорганизмы отражают истинную картину природного разнообразия, а затем и основной постулат классической микробиологии, утверждающий, что «ни один организм не может быть классифицирован, не будучи культивированным» (определитель Берги). Большинство фантомных филогенетических линий бактерий, первоначально определенных только по нуклеотидным последовательностям фрагмента гена малой субъединицы рибосомной РНК, год за годом находят своих культивируемых представителей, и их классификация начинает обретать традиционные очертания (Cohan, 2002; Gevers et al., 2005; Cohan, Perry, 2007; Gao, Gupta, 2012 и др.).

Очевидно, что молекулярно-генетические технологии снабдили и до сих пор снабжают нас беспрецедентным доступом к описанию разнообразия и состава бактериальных сообществ различных экосистем и впервые дают возможность идентифицировать численно доминирующие организмы и узнать больше об их распространении во времени и пространстве. Несомненно, развитие технологий высокопроизводительного секвенирования позволило исключить наиболее трудоемкую стадию – клонирования – из процесса получения метагеномных данных. Метагеномика – относительно новое направление в научных исследованиях, но за 15 лет своего официального существования прошла интересный эволюционный путь и является одним из наиболее результативных инструментов в молекулярной микробиологии. Первоначально – исключительно описательная по природе, предлагающая не более, чем список видов для множества

различных экосистем (Grahn et al., 2003; Gilbert et al., 2008; Wu et al., 2012 и др.). Позднее, ориентируясь на набор генов, найденных в природных образцах, появилась возможность предсказать функциональные особенности микробных сообществ. В настоящее время это направление в биологической науке обретает свое собственное «Я»: набор методических подходов, биоинформационная поддержка, теоретическое обоснование полученных результатов. Однако до сих пор большинство исследований, использующих молекулярные методы для определения бактериальных таксонов в природных водоемах, являются исключительно описательными по природе, предлагающими не более чем список видов для различных экосистем или пресловутое «собрание клонов», и отвечающими на вопросы «кто?» и «где?».

Несмотря на то, что описательный подход является необходимой первой стадией в прогрессе любой естественной науки, он не может снабдить нас способностью предвидеть, необходимой для создания синтетического понимания экологии микробных сообществ. Для эффективного дальнейшего развития необходимо ответить на вопросы «как?» и «почему?», сформировать структуру или каркас, в рамках которого определить количественное распределение таксонов или филотипов, основанное на процессе или механизме. Для комплексной оценки микробных сообществ необходимо получить, сравнить и оценить следующие показатели:

1. Разнообразие – характеризуется по наличию/отсутствию как крупных бактериальных таксонов, так и отдельных родов и видов микроорганизмов, являющихся индикаторами определенных физико-химических параметров среды обитания.

2. Структура сообщества – определяется количественными соотношениями отдельных бактериальных групп разного таксономического уровня.

3. Функциональная активность микробного сообщества – оценивается по наличию генов, кодирующих ключевые ферменты катаболических реакций.

Для количественных оценок отдельных таксономических групп в смешанных микробных популяциях используется ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР, кПЦР, англ. Real-time PCR, qPCR). Этот лабораторный метод используется для одновременной амплификации и измерения количества определенного вида последовательностей ДНК в образце (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов). Основное отличие от ПЦР состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для количественного определения используют два метода – флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные

молекулы ДНК, и модифицированные дезоксинуклеотиды, которые флюоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК. Для корректной количественной оценки необходимо использовать специфичные ДНК стандарты. Это может быть ДНК, изолированная из валидированных штаммов прокариот, или плазмидная ДНК, содержащая вставку фрагмента целевого гена известного микроорганизма. Проблемы, возникающие при использовании известных штаммов, очевидны: не все таксоны, доминирующие в тех или иных природных экосистемах, до сих пор являются культивируемыми, не для всех штаммов известна копийность целевых генов в геномной ДНК. На этой стадии целесообразнее использование традиционного и проверенного десятилетиями молекулярно-генетического подхода, основанного на амплификации, клонировании целевого ампликона, и его идентификации с помощью секвенирования по Сэнгеру. Такие библиотеки, содержащие культуры *Escherichiacoli* с плазидами с целевыми генами активно используются для изучения не только структуры микробных сообществ, но и функциональной активности отдельных физиологических групп микроорганизмов (Takai, Horikoshi, 2000; Yu et al., 2005; Lim et al., 2008; Botes et al., 2013 и др.).

Таким образом, использование молекулярно-биологических методов в микробной экологии включает широкий спектр подходов, основанных на анализе нуклеиновых кислот. Они обладают рядом явных преимуществ по сравнению с биохимическими или микробиологическими методами. Несомненно основное – это возможность анализа и идентификации бактерий без их предварительного культивирования. Однако к этому следует добавить уникальную возможность комплексного анализа микробных популяций, характеристики не только их разнообразия и составления «списка видов», но и структуры, функциональных особенностей и активности. Это становится возможным благодаря сочетанию таких методов как классическая и количественная ПЦР, клонирование и высокопроизводительное секвенирование.

Список литературы

Alain K., Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges // *Extremophiles*. 2009. V. 13. № 4. P. 583–594.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. P. 143–169.

Botes M., de Kwaadsteniet M., Cloete T.E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water // *Anal. Bioanal.Chem.* 2013. V. 405. № 1. P. 91–108.

Cohan F.M., Perry E.B. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 10. P. 373–386.

Cohan F.M. What are bacterial species? // *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. V. 56. P. 457–487.

Duetz W.A. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods // *Trends Microbiol.* 2007. V. 15. № 10. P. 469–475.

Ferris M.J., Muyzer G., Ward D.M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 2. P. 340–346.

Gao B., Gupta R.S. Microbial systematics in the post-genomics era. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012. V. 101. № 1. P. 45–54.

Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., Swings J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3. № 9. P. 733–739.

Gilbert J.A., Field D., Huang Y., Edwards R., Li W., Gilna P., Joint I. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 8: e3042.

Grahn N., Olofsson M., Ellnebo-Svedlund K., Monstein H.J., Jonasson J. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 219. № 1. P. 87–91.

Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature.* 2005. V. 437. № 7058. P. 543–546.

Lane D.J., Stahl D.A., Olsen G.J., Heller D.J., Pace N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences // *J. Bacteriol.* 1985. V. 163. P. 75–81.

Lewis K., Epstein S., D'Onofrio A., Ling L.L. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2010. V. 63. № 8. P. 468–476.

Lim J., Do H., Shin S.G., Hwang S. Primer and probe sets for group-specific quantification of the genera *Nitrosomonas* and *Nitrospira* using real-time PCR // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 99. № 6. P. 1374–1383.

Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments // *Arch. Microbiol.* 1995. V. 164. № 3. P. 165–172.

Pernthaler J., Amann R. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005. V. 69. № 3. P. 440–461.

Rappé M.S., Connon S.A., Vergin K.L., Giovannoni S.J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade // *Nature.* 2002. V. 418. № 6898. P. 630–633.

Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 49. P. 1379–1384.

Takai K., Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 11. P. 5066–5072.

Theron J., Cloete T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments // *Crit. Rev. Microbiol.* 2000. V. 26. № 1. P. 37–57.

Wu S.G., Tian J.Y., Gatesoupe F.J., Li W.X., Zou H., Yang B.J., Wang G.T. Intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and its origin as revealed by 454 pyrosequencing // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 29. № 9. P. 1585–1595.

Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 89. № 6. P. 670–679.

**ОТКРЫТИЕ НОВЫХ ТАКСОНОВ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ:
ПОЛИФАЗНЫЙ ПОДХОД**

А.Д. Темралеева

*Институт физико-химических и биологических
проблем почвоведения РАН
142290 Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, 2
E-mail: temraleeva.anna@gmail.com*

На примере собственных и литературных данных описано соответствие разным таксономическим рангам некоторых морфологических признаков у представителей зеленых водорослей. Рассмотрено использование различных генов при выделении и описании новых таксонов. Показана значимость экологических характеристик при видовой идентификации зеленых водорослей. Сделан вывод, что выделение новых таксонов зеленых водорослей или переописание и разделение уже существующих всегда должно основываться на полифазном подходе, комбинирующем набор морфологических и экологических признаков и диапазонов внутривидовой, межвидовой и межродовой генетической изменчивости по каждому из исследованных молекулярных маркеров. Подчеркивается, что данные свойства являются индивидуальными в зависимости от уровня таксономической категории и биологических особенностей исследуемой группы зеленых водорослей.

Ключевые слова: новые таксоны, зеленые водоросли, филогения, систематика, полифазный подход

**DISCOVERY OF NEW TAXONS OF GREEN ALGAE:
POLYPHASIC APPROACH**

A.D. Temraleeva

*Institute of physico-chemical and biological problems of soil science of RAS
142290 Moscow region, Pushchino, Institutskaia st., 2
E-mail: temraleeva.anna@gmail.com*

The correspondence of some morphological characters to different taxonomic ranks of green algae is described based on author's and previously published data. We considered use of different genes for discovery and description of new taxa. The significance of ecological characteristics for green algae species' identification was proved. We concluded that discovery of new taxa of green algae or reconsideration and distinguishing of existing ones must

be always based on polyphasic approach which implies a set of morphological and ecological features and ranges of intra-, interspecific and intergeneric genetic variability for every of molecular markers studied. We would like to stress that these features are specific to the taxonomic level and biological peculiarities of green algae groups under study.

Key words: new taxa, green algae, phylogeny, systematics, polyphasic approach

Систематика – это наука о многообразии организмов и их совокупностей. Основной ее задачей является построение естественной системы органического мира, которая правильно отражает биоразнообразие организмов и их взаимосвязи. По результатам классифицирования разрабатываются диагностические ключи, позволяющие определять систематическое положение исследуемых организмов. Для выделения новых таксонов используют различные признаки водорослей, выступающие в роли критериев. Признаки классифицируют по уровню их изменчивости (стабильные и изменчивые), по характеру проявления (качественные и количественные), по предмету исследования (морфологические, биохимические и т.д.). На протяжении 19 и 20 вв. основным таксономический вес при идентификации зеленых водорослей имели морфологические и размерные характеристики. Морфологическая концепция вида, доминировавшая в этот период, рассматривала вид как группу морфологически идентичных или сходных организмов. Однако выбор морфологического критерия для точной видовой диагностики или описания нового таксона достаточно сложен. Многие морфологически сходные зеленые водоросли вследствие конвергентной эволюции и упрощения морфологии до одноклеточных или простых нитчатых форм являются полифилетическими (Lewis, McCourt, 2004). За последнее десятилетие была показана полифилия ряда родов зеленых водорослей: *Chlorella* (Luo et al., 2010), *Trebouxia* (Skaloud, Peksa, 2010), *Chlamydomonas* (Pröschold et al. 2001; Pröschold, Leliaert, 2007), *Planophila* (Friedl, O’Kelly, 2002), *Chlorosarcinopsis* (Watanabe et al., 2006a) и др. Конвергентная эволюция, особенно у простых форм микроорганизмов, может привести к недооценке биологического разнообразия, как было уже неоднократно продемонстрировано в исследованиях криптических видов зеленых водорослей (Lewis, Flechtner, 2004; Skaloud, Peksa, 2010). С другой стороны, фенотипическая пластичность может привести к резкому увеличению количества видов вследствие принятия различных морфологических форм зеленых водорослей за различные виды, а, следовательно, к переоценке видового разнообразия. Например, видовое богатство некоторых родов зеленых водорослей является удивительно большим, например род *Chlamydomonas* состоит из 1166, *Scenedesmus* –

из 486, *Chlorella* – из 106, *Chlorococcum* – из 84, *Characium* – из 93 видов и внутривидовых таксонов, описанных преимущественно по морфологии (Guiry, Guiry, 2014). Л.А. Левис и В.Р. Флехтнер (Lewis, Flechtner, 2004), приняв во внимание высокую фенотипическую пластичность рода *Scenedesmus*, предполагают, что молекулярный анализ выявит на порядок меньше видов, чем уже описано в литературе с помощью морфологических критериев. Таким образом, упор исключительно на морфологию зеленых водорослей и предположение о том, что сходная морфология свидетельствует о близком генетическом родстве, может привести к неточностям и даже ошибкам в систематике таксонов. По мере накопления новых данных об ультраструктурных и физиолого-биохимических свойствах водорослей стало очевидно, что использование исключительно фенотипических признаков, в некоторых случаях нестабильных и весьма изменчивых, недостаточно для четкого разграничения границ таксонов различного ранга. С развитием молекулярных технологий, филогенетическая концепция вида, основанная на генетической однородности популяции, выходит на первый план. Однако использовать ее необходимо не взамен традиционным подходам в систематике водорослей, а совместно с ними. Именно из-за отсутствия однозначного и универсального критерия определения вида для оценки общего богатства видов и разнообразия зеленых водорослей в водных и наземных экосистемах, интерпретации их экологии и биогеографии требуется полифазный подход, учитывающий морфологические, ультраструктурные, биохимические, физиологические, экологические и молекулярные данные. Поэтому большинство современных работ по открытию новых для науки таксонов (Watanabe et al., 2006a, б; Aslam et al., 2007; Zhang et al., 2008; Nakada, Nozaki, 2009; Nemcová et al., 2011; Neustupa et al., 2011, 2013a, б и др.) или ревизии уже описанных (Darienکو et al., 2010; Fucíková, Lewis, 2012; Hegewald et al., 2013; Skaloud et al., 2013; Matsuzaki et al., 2014 и др.) основывается именно на этом подходе.

Использование морфологических данных при выделении и описании новых таксонов зеленых водорослей

В соответствии с полифазным подходом первым шагом к выделению и валидации нового таксона зеленых водорослей является описание его морфологии и жизненного цикла. Среди морфологических признаков при таксономическом определении зеленых водорослей традиционно используют следующие:

1. тип организации таллома;
2. форма вегетативных клеток;
3. количество и форма хлоропласта;
4. способность к образованию колоний и их форма;

5. строение клеточных оболочек и наличие слизистых образований;
6. наличие, количество и строение пиреноидов;
7. количество ядер;
8. тип размножения;
9. наличие, форма и расположение стигмы;
10. расположение, количество и тип жгутиков;
11. накопление запасных питательных веществ.

Разберем соответствие таксономическим рангам данных морфологических признаков у представителей 2-х классов зеленых водорослей *Chlorophyceae* и *Trebouxiophyceae*, используя собственные и литературные данные.

Тип организации таллома

Многие системы зеленых водорослей на основе морфологической концепции вида признавали тип организации таллома признаком на уровне порядков (Андреева, 1998; Pröschold, Leliaert, 2007). С развитием молекулярно-филогенетического анализа было неоднократно показано с помощью различных независимых молекулярных маркеров, что близкородственные таксоны часто имеют абсолютно различную организацию таллома. Так водоросли некоторых видов рода *Chlamydomonas* с монадной организацией генетически более близки к сарциноидным видам родов *Fasciculochloris*, *Heterotetracystis* и *Hemiflagellochloris*, а не монадным родам *Lobochlamys*, *Oogamochlamys*, *Chloromonas* (Watanabe et al., 2006 б). По данным Л.А. Левис и Ф.Р. Трайнора (Lewis, Trainor, 2012) минимальное генетическое различие показали коккоидные водоросли рода *Spongiochloris*, род *Protosiphon* с сифональной (неклеточной) организацией и *Chlorosphaeropsis*, образующий сарциноидные пакеты клеток. Таким образом, накопленный опыт в области молекулярной систематики не позволяет считать данный признак надежным для разграничения таксонов на уровне порядков и семейств, но хорошо разделяет близкородственные роды.

Форма вегетативных клеток,

способность к образованию колоний и их форма

В традиционной систематике форма клетки зеленых водорослей используется как диагностический признак на родовом и видовом уровнях (Андреева, 1998). Например, различная форма клеток, способность образовывать колонии и их различная форма являются надежными диакритическими признаками, разделяющими роды зеленых водорослей семейства *Selenastraceae*: *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Monoraphidium*, *Nephrochlamys*, *Podohedriella*, *Quadrigula*, *Raphidocelis*, *Rhombocystis*, *Selenastrum* и *Tetranephris*. Данные морфологические

свойства хорошо согласуются с молекулярным анализом 18S рДНК (Krienitz, Bock, 2012).

Количество хлоропластов и их форма

В современной систематике зеленых водорослей тип хлоропластов (центральный или пристенный) и их количество оцениваются как признаки родового уровня, форма хлоропласта, как правило, используется при разграничении видов (Андреева, 1998). Нам неизвестно ни одного рода зеленых водорослей, виды которого имели бы разные типы хлоропластов в зрелых вегетативных клетках. Однако наличие одного типа хлоропласта или одинаковое их количество у двух близкородственных родов, например *Chlorella* и *Parachlorella*, не означает их таксономической невалидности (Krienitz et al., 2004).

Строение клеточных оболочек и наличие слизистых образований

При определении водорослей обычно отмечают толщину слизистой оболочки и ее изменения при старении культуры, гомогенность или слоистость слизи, наличие отдельных выростов и утолщений, остатков спорангиев и др. В традиционной систематике зеленых водорослей различные типы слизистых образований использовались в качестве признаков, разделяющих виды и роды. Например, разграничение видов *Bracteacoccus minor* и *B. pseudominor* в традиционной системе основано на отсутствии у последнего пузыревидного слизистого выроста на клеточной оболочке (Андреева, 1998). Анализ ядерного гена 18S рДНК и пластидного гена *rbcL* подтвердили самостоятельность этих видов (Fučíková, Lewis, 2012). Еще одним примером может послужить разделение родов *Scotiellopsis* и *Coelastrellana* на основе наличия полярных утолщений клеточной оболочки у первого рода и их отсутствия у второго (Kalina, Punčochářová, 1987). Однако дальнейший анализ на основе данных по 18S рДНК и ITS2 показал несостоятельность этого разделения (Hegewald, Nanagata, 2000; Kaufnerová, Eliás, 2013). Собственные данные по изучению морфологии, ультраструктуры и филогении членов клады *Watanabea* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) свидетельствуют, что кластеризация родов *Heveochlorella*, *Kalinella*, *Chloroidium*, *Heveochlorella* от группы *Watanabea*+*Viridiella* по данным 18S рДНК также подтверждается наличием у последней однослойной клеточной стенки. Поэтому данный признак в исследованной кладе можно использовать в систематике надродовых таксонов – возможно, семейств.

Наличие, количество и строение пиреноидов

Большинство систематиков сходятся во мнении, что наличие/отсутствие пиреноидов является диагностическим признаком видового уровня (Константинова, Болдина, 2000). И. Неуступа с

коллегами (Neustupa et al., 2007) обнаружили, что штамм водоросли, описанный исходно как морфовид *Klebsormidium marinum*, по молекулярным данным относится к роду *Stichococcus*, несмотря на присутствие пиреноида с крахмальной оберткой, что считалось одним из диакритических признаков, разделяющих эти таксоны. Этот же коллектив авторов в 2009 году описал новый род зеленых водорослей – *Kalinella* с типовым видом *K. bambusicola*, хлоропласт которой содержал пиреноид (Neustupa et al., 2009). Спустя 4 года ими же был обнаружен новый вид данного рода – *K. apyrenoidosa* без пиреноида (Neustupa et al., 2013a). Еще один показательный пример – традиционное разделение родов *Chlamydomonas* и *Chloromonas* на основе отсутствия пиреноида у последнего (Ettl, 1970, 1983). Первое же молекулярное исследование этих морфологически различных таксонов показало несостоятельность подобного разделения (Buchheim et al., 1997) и в настоящее время род *Chloromonas* включает в себя виды как с пиреноидами, так и без (Hoham et al., 2002; Matzuzaki et al., 2012). Нами был описан новый вид рода *Watanabea* пиреноидом, хотя у типового вида *W. reniformis* пиреноид отсутствует.

Количество ядер

Как правило, клетки зеленых водорослей одноклеточные, многоядерные вегетативные клетки встречаются нечасто. Объединение одноклеточных и многоядерных видов в один род, например, *Deasonia* (= *Ascochloris*) и *Neosporangium* (Deason, 1984), не оправдывалось при исследовании филогенетических взаимосвязей по данным генов 18S рДНК и *rbcL* (Skaloud et al., 2013). По-видимому, различное количество ядер свидетельствует о различиях как минимум на уровне рода.

Тип размножения

Способам размножения в настоящее время придается серьезное диагностическое значение. Особый вес в современной таксономии зеленых водорослей имеют тип клеточных покровов у зооспор и тонкое строение жгутикового аппарата монадных клеток (вегетативных или зооспор). Эти признаки хорошо согласуются с молекулярными исследованиями зеленых водорослей (Watanabe et al., 2006b).

Наличие, форма и расположением стигмы

Для разграничения видов рода *Microglena* были успешно использованы такие характеристики стигмы как длина, форма и положение (Demchenko et al., 2012). Группа украинских альгологов под руководством И.Ю. Костикова описала новый вид рода *Chlorochytrium* – *Ch. hypanicus* (Костиков и др., 2012). Новый вид отличается от типового – *Ch. lemnae* – передней стигмой у зооспор. Анализ данных гена 18S рДНК

обоих видов не позволил надежно их разделить, однако сравнение интронов в данном гене может подтвердить обоснованность выделения нового вида.

Расположение, количество и тип жгутиков

Монадные вегетативные клетки и монадные стадии в жизненном цикле (зооспоры и гаметы) водорослей снабжены жгутиками, количество, длина, морфология, место прикрепления и характер движения которых достаточно разнообразны у водорослей, но постоянны внутри родственных групп. В целом, морфологические различия жгутиков вегетативных клеток или зооспор, видимые при световой микроскопии, позволяют разделять зеленые водоросли на уровне видов и родов; для исследований более высоких таксономических рангов (порядков, классов) необходимы ультраструктурные исследования жгутикового аппарата.

Накопление запасных питательных веществ

В качестве запасных питательных веществ у зеленых водорослей обычно указывают крахмал, липиды, изредка волютин и белковые гранулы. Некоторые группы зеленых водорослей способны к гиперсинтезу вторичных каротиноидов. Данный признак наряду с другими И.Ю. Костиков (Костиков и др., 2012) предложил использовать для выделения порядка *Protosiphonales* внутри класса *Chlorophyceae*, соответствующего молекулярной кладе *Stephanospharinia* (Nakada et al., 2008). Несколько близкородственных родов порядка *Sphaeropleales* (*Chlorophyceae*) – *Muriella*, *Bracteacoccus* и *Chromochloris* – также объединяет способность синтезировать каротиноиды, окрашивающие культуры в ярко-оранжевый цвет (Fučíková et al., 2012). Для недавно открытых 3-х новых родов данного порядка: *Rotundella*, *Tumidella* и *Bracteamorpha* – также была характерна эта особенность (Fučíková et al., 2014). Следует отметить, что данная способность, возможно, связана с почвенными условиями жизни всех перечисленных таксонов.

Тем не менее, некоторые морфологические характеристики являются приспособительными и зависят от условий окружающей среды, а, следовательно, могут быть достаточно вариабельными. Например, слизь, соединяющие тяжи, одиночный или колониальный образ жизни, формирование игл у видов *Chlorella*-клады являются адаптивным ответом на факторы окружающей среды, такие как выедание, эндосимбиотическое или наземное существование (Luo et al., 2010). Представители рода зеленых водорослей *Mychonastes* традиционно отличали от *Pseudodictyosphaerium* по образу жизни: свободноживущие в первом случае и колониальные во втором. Однако это морфологическое различие родов не подтвердилось молекулярными данными, и оба таксона были объединены в род *Mychonastes* (Krienitz et al., 2011). В некоторых работах

убедительно показано, что такие морфологические признаки видов как присутствие и форма шипов, величина колонии у представителей рода *Scenedesmus* зависят от температуры окружающей среды (Trainor, 1991; Trainor, Egan 1991). Таким образом, перечисленные признаки не могут быть диагностически значимыми при таксономическом разделении данных родов.

Использование молекулярно-генетических данных при выделении и описании новых таксонов зеленых водорослей

На современном этапе развития науки описание и валидация новых таксонов невозможна без применения молекулярно-генетических методов. Одним из популярных подходов является ДНК-штрихкодирование, суть которого состоит в молекулярной классификации видового разнообразия всего живого мира на основе расшифровки одного и того же участка генома (ДНК-штрихкод), последовательность которого будет одинаковой у особей одного вида, но различна для разных видов. Для таксономической идентификации зеленых водорослей и определения их систематического положения используют целый ряд молекулярных маркеров (Темралеева и др., 2013).

1. Традиционно ядерный ген 18S рДНК является главным филогенетическим маркером для зеленых водорослей. Однако использование одного этого консервативного гена часто не может обеспечить достаточной вариабельности для разделения близкородственных видов, а, следовательно, надежно определить их таксономическую принадлежность. Так, например, в статье Е.В. Минчевой с соавт. (2013) показано, что использование маркера 18S не позволяет подтвердить таксономический статус зеленых водорослей родов *Draparnaldioides*, *Draparnaldia* и *Chaetophora*, в отличие от ITS. Разграничение видов рода *Chlorosarcinopsis* с помощью 18S маркера также невозможно, в отличие от видов рода *Bracteacoccus* (Hall et al., 2010). Таким образом, использование 18S рДНК целесообразно именно в филогенетических работах: для разделения эволюционно более древних родов (например, в работах Aboal, Werner, 2011; Neustupa et al., 2011) или выявления новых филогенетических линий (De Wever et al., 2009; Horath, Bachofen, 2009). В то время как для целей идентификации водорослей на уровне видов, в том числе описании новых, он может оказаться неуспешным молекулярным маркером. Кроме того, ген 18S рДНК зеленых водорослей не удовлетворяет такому важному требованию к штрихкоду как короткая длина – не более 700-800 п.н. для облегчения выделения, амплификации и секвенирования ДНК (Шнеер, 2009а). Методическим решением указанной проблемы является предложение использовать в качестве ДНК-штрихкода фрагмент этого гена длиной около 400 п.н. – регион V4, который был успешно использован для

таксономической идентификации диатомовых водорослей (Zimmermann et al., 2011).

2. Ген хлоропластной рибосомальной большой субъединицы 23S (универсальный пластидный ампликон UPA) также используется в молекулярно-генетических исследованиях зеленых водорослей. Однако последние исследования подтвердили, что он является менее вариабельным, чем другие маркеры, в т.ч. и другие хлоропластные гены (Sherwood et al., 2008; Clarkston, Saunders, 2010).

3. Хлоропластный ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу фермента рибулозобифосфат-карбоксилазы, постепенно становится стандартным вторым маркером для зеленых водорослей после 18S, и топологии филогенетических деревьев, построенных на основе этих двух маркеров, как правило, совпадают. Однако существуют и исключения. Например, топология дерева на основе данных по гену *rbcL* отличается от таковой по гену 18S рДНК: семейство Oocystaceae не образует кластер внутри порядка Chlorellales (Thüs et al., 2011; Novis, Visnovsky, 2012). Кроме того, не разработаны универсальные праймеры, комплементарные фрагменту данного гена, которые бы успешно амплифицировались у всех представителей отдела Chlorophyta (Nozaki et al., 1995, 1999, 2000; Buchheim et al., 2010). Вследствие чрезвычайной вариабельности *rbcL* у зеленых водорослей он не является, по сути, универсальным геном. Как альтернатива *rbcL* были предложены другие пластидные гены: *matK*, кодирующий матуразу К, *rpoB* и *rpoC1*, кодирующие субъединицы РНК-полимераз, и межгенный спейсер *trnH-psbA*, расположенный между генами гистидиновой тРНК и геном, контролирующим синтез белка D1 фотосистемы II (Матвеева и др., 2011). В работе Л. Келли с соавт. (Kelly et al., 2010) показано, что локусы *matK* и *rpoC1* являются наиболее вариабельными у водных растений семейства Podostemaceae. Рабочая группа по изучению ДНК-штрихкодирования растений (CBOL Plant Working Group, 2009) рекомендовала использовать в качестве молекулярных маркеров наземных растений *rbcL* и *matK*. Однако пока не удалось амплифицировать *matK* у зеленых водорослей (Pombert et al., 2005; Buchheim et al., 2011) и мхов (von Cräutlein et al., 2011).

4. Ген *tufA*, кодирующий фактор элонгации белкового синтеза хлоропластов, был предложен относительно недавно и исследован в основном у морских зеленых водорослей (Fama et al., 2002). В целом, геномы хлоропластов полезны для филогенетических реконструкций вследствие относительно высокого содержания генов и более плотной их упаковки. Кроме того, в отличие от многих ядерных генов, которые являются по своей природе мультикопийными и могут запутать филогенетическую реконструкцию, гены органелл, как правило, являются однокопийными и не вызывают таких проблем (Leliaert et al., 2012).

5. Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) ядерного рибосомального оперона широко используются для разделения зеленых водорослей на видовом уровне (Verbruggen et al., 2006; Coleman, 2007; Mei et al., 2007; Keller et al., 2008; O’Kelly et al., 2010). ITS1 расположен между геном малой ядерной рибосомальной субъединицы (18S) и геном 5.8S рДНК, ITS2 – между геном 5.8S рДНК и геном большой ядерной рибосомальной субъединицы (28S). Длина локуса в зависимости от таксона варьирует от нескольких сотен до более чем тысячи пар нуклеотидов. ITS1 и ITS2 вариабельны и многокопийны, что позволяет их легко амплифицировать у практически всех Viridiplantae с помощью одного набора универсальных праймеров (White et al., 1990). Кроме того, они примыкают к консервативному участку 5.8S рДНК и фланкированы консервативными генами 18S и 28S рДНК, что облегчает создание праймеров (Шнеер, 2009б). По эффективности амплификации у зеленых водорослей ген ITS2 предпочтительнее *rbcL* (Buchheim et al., 2011). Однако к недостаткам ITS1 и ITS2 можно отнести высокую вариабельность длины и инделей, сложность в выравнивании и определении ортологии (Feliner, Rosseló, 2007; Poczaí, Hyvärinen, 2010).

6. 5'-фрагмент субъединицы 1 митохондриального белоккодирующего гена цитохром С оксидазы (CO1 или *cox1*), широко используемый для животных (Moore, 1995; Ferri et al., 2009; Wilson, 2010), некоторых таксонов красных (Sherwood et al., 2008; Le Gall, Saunders, 2010), бурых (McDevit, Saunders, 2010) и диатомовых водорослей (Evans et al., 2007), наиболее детально изучен из всех молекулярных маркеров.

Если сравнивать между собой все предложенные локусы, то *rbcL*, ITS2 и *tufA* обладают умеренной и сильной степенью вариабельности (Hall et al., 2010). CO1, 18S и 23S (UPA) меньше подходят в качестве молекулярных маркеров: 18S и 23S недостаточно вариабельные, а CO1 не амплифицируется у большинства таксонов (Hall et al., 2010). Для описания новых таксонов М. Бухгейм с коллегами использовали маркеры 18S рДНК и 26S рДНК и ITS2, выделив 4 дополнительных рода: *Stauridium*, *Pseudopediastrum*, *Monactinus* и *Parapediastrum* (Buchheim et al., 2005). Однако Х. Макманус и Л. Левис (McManus, Lewis, 2011), применяя для молекулярно-филогенетического анализа два молекулярных маркера (26S рДНК и *rbcL*), выделили в том же семействе Hydrodictyaceae только 2 рода – *Stauridium* и *Monactinus* и подчеркнули, что систематика остальных родов требует уточнения и комплексного изучения.

В целом, при выборе молекулярного маркера для описания новых таксонов зеленых водорослей и интерпретации полученных филогенетических результатов исследователю следует руководствоваться следующими принципами:

1. Для получения надежного результата необходимо использовать несколько независимо эволюционирующих маркеров, например ядерных и

хлоропластных. Как правило, молекулярный анализ одного гена не обеспечивает достаточного разрешения для определения систематического положения большинства организмов, а иногда дает противоречивые результаты (как отмечено в примерах выше), которые часто связывают с ограниченным числом выровненных нуклеотидов или с различной скоростью генетической эволюции микроорганизмов. Молекулярный анализ, основанный на использовании нескольких генов, увеличивает филогенетическое разрешение и лучше согласуется с морфологическими признаками таксона (Gontcharov et al., 2004).

2. При описании новых таксонов со значительным уровнем дивергенции (семейства, порядки) нужен менее изменчивый маркер (например, 18S) по сравнению с тем, который потребуется для описания новых видов и родов. То есть, если в молекулярном анализе использовать очень изменчивый маркер, то в случае популяционно-генетических исследований он будет работать хорошо, но на видовом уровне плохо. Существует риск случайного проявления завышенных оценок генетического расстояния и, как следствие, подвиды становятся видами. В работах часто можно наблюдать дробление одного вида на несколько, без подкрепления межвидовых различий морфологическими, физиологическими и цитологическими характеристиками, а также экологическими особенностями.

3. Абсолютную точность видовой идентификации может дать только 100%-е совпадение нуклеотидных последовательностей маркера при сравнении исследованного штамма водорослей с эталонным (ваучерным). Но и здесь есть исключения, например, при исследовании филогенетических связей внутри клады *Stephanosphaerina* нами было обнаружено, что у двух видов рода *Chlorochytrium* (*Ch. lemnaei* и *Ch. hypanicus*) нет замен при сравнении нуклеотидных последовательностей гена 18S рДНК. Тем не менее, различия в длине и последовательности интрона, а также морфологические и экологические отличия позволяют разграничить эти два вида. Во всех остальных случаях, когда гомологичность нуклеотидных последовательностей генов двух штаммов меньше 100%, возникает вопрос о проведении видовых и родовых границ. Так при изучении той же клады нами было показано, что необходимый и достаточный уровень межвидовых генетических различий составляет 0.8-1% и межродовых – 1.4-3.2% для гена 18S рДНК, а для *rbcL* – 3.9-5.7% и 5.8-11.9, соответственно. Подобные диапазоны генетических дистанций следует установить для каждой конкретной группы водорослей и использовать их при выделении новых видов и родов.

Использование экологических данных при выделении и описании новых таксонов зеленых водорослей

При выделении нового вида *Ch. hypanicus* И.Ю. Костиков с соавторами отметили его свободноживущий образ жизни, в отличие от эндофитного типового вида *Ch. lemnae*. Это отличие в совокупности с другими свойствами и позволило авторам описать новый таксон (Костиков и др., 2012). Как показало исследование Skaloud и Peksa (2010), данные об экологической нише рода *Asterochloris* могут быть использованы даже для разделения морфологически идентичных (криптических) видов. К сожалению, для уже описанных и депонированных в альгологические коллекции штаммов водорослей очень редко встречаются подробные описания экологических условий местообитания, что затрудняет интерпретацию их филогенетических связей с условиями окружающей среды и поиск надежных морфологических характеристик.

Таким образом, морфологические и экологические данные во многих случаях не противоречат данным молекулярной филогении, а поддерживают ее. Тем не менее, диагностические морфологические признаки, используемые в традиционной систематике зеленых водорослей, следует пересмотреть и оценить их надежность и значимость на конкретных таксономических уровнях. Выделение новых таксонов зеленых водорослей или переописание и разделение уже существующих всегда должно основываться на полифазном подходе. Именно такой подход использует набор морфологических, ультраструктурных и экологических признаков и диапазонов внутривидовой, межвидовой и межродовой генетической изменчивости по каждому из исследованных молекулярных маркеров. Следует подчеркнуть, что данные свойства являются индивидуальными в зависимости от уровня таксономической категории и биологических особенностей исследуемой группы. Однако даже при учете вышеперечисленных рекомендаций выделение нового таксона и определение его положения в системе органического мира без однозначных и четких критериев вида является мнением конкретного эксперта.

Список литературы

- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998. 351 с.
- Константинова И.А., Болдина О.Н. Сравнительный анализ ультраструктуры пиреноидов зеленых монадных и коккоидных водорослей // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 5. С. 747–751.

Костиков И.Ю., Демченко Э.Н., Бойко В.Р., Гончаров А.А. *Chlorochytrium hypanicus* sp. nov. (Chlorophyceae) и его место в системе Protosiphonales // Альгология. 2012. Т. 22. № 3. С. 227–249.

Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. и др. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 1. С. 32–43.

Минчева Е.В., Перетолчина Т.Е., Ижболдина Л.А. и др. Эволюционные связи эндемичной зеленой водоросли озера Байкал *Draparnaldioides simplex* с небайкальскими таксонами семейства Chaetophoraceae (Chlorophyta) // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 181–184.

Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Щербаков Д.Ю., Пинский Д.Л. ДНК-штрихкодирование зеленых водорослей: обзор // Альгология. 2013. Т. 23. № 4. С. 396–418.

Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журнал общей биологии. 2009а. Т. 70. № 4. С. 296–315.

Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. 2009б. Т. 45. № 11. С. 1436–1448.

Aboal M., Werner O. Morphology, fine structure, life cycle and phylogenetic analysis of *Phyllosiphon arisari*, a siphonous parasitic green alga // Eur. J. Phycol. 2011. V. 46. № 3. P. 181–192.

Aslam Z., Shin W., Kim M.K. et al. *Marinichlorella kaistiae* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) based on polyphasic taxonomy // J. Phycol. 2007. V. 43. № 3. P. 576–584.

Buchheim M., Buchheim J., Carlson T. et al. Phylogeny of the Hydrodictyaceae (Chlorophyceae): inferences from rDNA data // J. Phycol. 2005. V. 41. №5. P. 1039–1054.

Buchheim M.A., Buchheim J.A., Chapman R.L. Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): a study of 18S ribosomal RNA gene sequences // J. Phycol. 1997. V. 33. № 2. P. 286–293.

Buchheim M.A., Keller A., Koetschan C. et al. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life // PLoS ONE. 2011. V. 6. № 2. P. 16931.

Buchheim M.A., Kirkwood A., Buchheim J.A. et al. Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae) // J. Phycol. 2010. V. 46. № 5. P. 1038–1047.

CBOL Plant Working Group, Hollingsworth P.M., Forrest L.L., Spouge J.L. et al. A DNA barcode for land plants // Proc. Nat. Acad. Sci. 2009. V. 106. № 31. P. 12794–12797.

Clarkston B.E., Saunders G.W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. // Botany. 2010. V. 88. № 2. P. 119–131.

Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. № 10. P. 3322–3329.

Darienko T., Gustavs L., Mudimu O. et al. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Eur. J. Phycol. 2010. V. 45. № 1. P. 79–95.

De Wever A., Leliaert F., Verleyen E. et al. Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia // Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci. 2009. V. 276. № 1673. P. 3591–3599.

Deason T.R. A discussion of the classes Chlamydomphyceae and Chlorophyceae and their subordinate taxa // Plant. Syst. and Evol. 1984. V. 146. № 1-2. P. 75–86.

Demchenko E., Mikhailyuk T., Coleman A.W., Proschold T. Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach // Eur. J. Phycol. 2012. V. 47. № 3. P. 264–290.

Ettl H. Die Gattung *Chloromonas* Gobi emend. Wille (*Chlamydomonas* und Die Nächstverwandten Gattungen I) // Nova Hedwigia. 1970. Beihefte 34. P. 1–283.

Ettl H. Chlorophyta I. Phytomonadina. In: Süßwasserflora von Mitteleuropa (Ed. by H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer), vol. 9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart & New York, 1983. 807 pp.

Evans K.M., Wortley A.H., Mann D.G. An assessment of potential diatom «barcode» genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta) // Protist. 2007. V. 158. № 3. P. 349–364.

Fama P., Wysor B., Kooistra W.H.F.C., Zuccarello G.C. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Cauleriales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene // J. Phycol. 2002. V. 38. № 5. P. 1040–1050.

Feliner G.N., Rosseló J.A. Better the devil to know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // Mol. Phyl. Evol. 2007. V. 44. № 2. P. 911–919.

Ferri E., Barbuto M., Bain O. et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda) // Front. Zool. 2009. № 6. P. 1.

Friedl T., O’Kelly C.J. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure // Eur. J. Phycol. 2002. V. 37. № 3. P. 373–384.

Fučíková C., Lewis L.E. Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta) // Fottea. 2012. V. 12. № 1. P. 83–93.

Fučíková K., Lewis P.O., Lewis L.A. Putting incertae sedis taxa in their place: a proposal for ten new families and three new genera in Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2014. V. 50. № 1. P. 14–25.

Gontcharov A.A., Marin B., Melkonian M. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and *rbcL* sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta) // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. № 3. P. 612–624.

Guiry M.D., Guiry G.M. 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 28 July 2014.

Hall J.D., Fučíková K., Lo C. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae // Cryptogamie, Algol. 2010. V. 31. № 4. P. 529–555.

Hegewald E., Bock C., Krienitz L. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) // Fottea. 2013. V. 14. № 2. P. 149–164.

Hegewald E., Hanagata N. Phylogenetic studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta) // Algal. Stud. 2000. № 100. P. 29–49.

Hoham R.W., Bonome T.A., Martin C.W., Leebens-Mack J.H. A combined 18S rDNA and *rbcL* phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats // J. Phycol. 2002. V. 38. № 5. P. 1051–1064.

Horath T., Bachofen R. Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the central Alps (Switzerland) // Microbiol. Ecol. 2009. V. 58. № 2. P. 290–306.

Kalina T., Punčochářová M. Taxonomy of the subfamily Scotielloecystoideae Fott 1976 (Clorellaceae, Chlorophyceae) // Algal. Stud. 1987. № 45. P. 473–521.

Kaufnerová V., Eliáš M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. 2013. V. 97. № 3-4. P. 415–428.

Keller A., Schleicher T., Forster F. et al. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales) // BMC Evol. Biol. 2008. № 8. P. 218.

Kelly L.J., Ameka G.K., Chase M.W. DNA barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): a test of proposed barcode regions // Taxon. 2010. V. 59. № 1. P. 251–260.

Krienitz L., Bock C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters // Hydrobiologia. 2012. V. 698. № 1. P. 295–326.

Krienitz L., Ustinova I., Friedl T., Huss V.A.R. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2001. V. 37. № 5. P. 852–865.

Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D. et al. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Phycol. 2004. V. 43. № 5. P. 529–542.

Le Gall L., Saunders G.W. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora // Ibid. 2010. V. 46. № 2. P. 374–389.

Leliaert F., Smith D.R., Moreau H. et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae // Crit. Rev. Plant Sci. 2012. № 31. P. 1–46.

Lewis L.A., McCourt R.M. Green algae and the origin of land plants // Am. J. Bot. 2004. V. 91. № 10. P. 1535–1556.

Lewis L.A., Trainor F.R. Survival of *Protosiphon botryoides* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from a Connecticut soil dried out for 43 years // Phycol. 2012. V. 51. № 6. P. 662–665.

Lewis L.A., Flechtner V.R. Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of western North America // J. Phycol. 2004. V. 40. № 6. P. 1127–1137.

Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Plant Biol. 2010. V. 12. № 3. P. 545–553.

Matsuzaki R., Hara Y., Nozaki H. A taxonomic study of snow *Chloromonas* species (Volvocales, Chlorophyceae) based on light and electron microscopy and molecular analysis of cultured material // Phycologia. 2014. V. 53. № 3. P. 293–304.

Matzuzaki R., Hara Y., Nozaki H. A taxonomic revision of *Chloromonas reticulata* (Volvocales, Chlorophyceae), the type species of the genus *Chloromonas*, based on multigene phylogeny and comparative light and electron microscopy // Phycol. 2012. V. 51. № 1. P. 74–85.

McDevit D.C., Saunders G.W. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights // Phycol. 2010. V. 49. № 3. P. 235–248.

McManus H.A., Lewis L.A. Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with an emphasis on *Pediastrum duplex* // J. Phycol. 2011. V. 47. № 1. P. 152–163.

Mei H., Luo W., Liu G.X., Hu Z.Y. Phylogeny of Oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rDNA sequences with emphasis on the relationships in the genus *Oedogonium* based on ITS-2 sequences // Plant Syst. Evol. 2007. V. 265. № 3-4. P. 179–191.

Moore W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees // Evolution. 1995. V. 49. № 4. P. 718–726.

Nakada T., Misawa K., Nozaki H. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses // Mol. Phylogenet. Evol. 2008. V. 48. № 1. P. 281–291.

Nakada T., Nozaki H. Taxonomic study of two new genera of fusiform green flagellates, *Tabris* gen. nov. and *Hamakko* gen. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) // J. Phycol. 2009. V. 45. № 2. P. 482–492.

Nemcová Y., Eliás M., Skaloud P. et al. *Jenufa* gen. nov.: a new genus of coccoid green algae (Chlorophyceae, incertae sedis) previously recorded by environmental sequencing // J. Phycol. 2011. V. 47. № 4. P. 928–938.

Neustupa J., Eliás M., Skaloud P. et al. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // Phycol. 2011. V. 50. № 1. P. 57–66.

Neustupa J., Nemcová Y., Eliás M., Skaloud P. 2009. *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia // Phycol. Research. 2011. V. 57. № 3. P. 159–169.

Neustupa J., Nemcová Y., Veselá J. et al. *Leptochlorella corticola* gen. et sp. nov. and *Kalinella apyrenoidosa* sp. nov.: two new *Chlorella*-like green microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from subaerial habitats // Int. J. Syst. and Euk. Microb. 2013a. № 63. P. 377–387.

Neustupa J., Nemcová Y., Veselá J. et al. *Parachloroidium* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel genus of coccoid green algae from subaerial corticolous biofilms // Phycol. 2013b. V. 52. № 5. P. 411–421.

Neustupa J., Eliás M., Sejnohová L. A taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid // Nova Hedwigia. 2007. № 84. P. 51–63.

Novis P.M., Visnovsky G. Novel alpine algae from New Zealand: Chlorophyta // Phytotaxa. 2012. № 39. P. 1–30.

Nozaki H., Itoh M., Sano R. et al. Phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta) inferred from *rbcL* gene sequence data // J. Phycol. 1995. V. 31. № 6. P. 970–979.

Nozaki H., Misawa K., Kajita T. et al. Origin and evolution of the colonial Volvocales (Chlorophyceae) as inferred from multiple, chloroplast gene sequences // Mol. Phyl. Evol. 2000. V. 17. № 2. P. 256–268.

Nozaki H., Ohta N., Takano H., Watanabe M.M. Reexamination of phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta): an analysis of *atpB* and *rbcL* gene sequences // J. Phycol. 1999. V. 35. № 1. P. 104–112.

O'Kelly C.J., Kurihara A., Shipley T.C., Sherwood A.R. Molecular assessment of *Ulva* spp. (Ulvophyceae, Chlorophyta) in the Hawaiian Islands // J. Phycol. 2010. V. 46. № 4. P. 728–735.

Poczai P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // Mol. Biol. Rep. 2010. V. 4. № 4. P. 1897–1912.

Pombert J.F., Otis C., Lemieux C., Turmel M. The chloroplast genome sequence of the green alga *Pseudendoclonium akinetum* (Ulvophyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages // Mol. Biol. Evol. 2005. V. 22. № 9. P. 1903–1918.

Pröschold T., Leliaert F. Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approaches // Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of the Algae Systematics. London: Taylor and Francis, 2007. P. 123–153.

Pröschold T., Marin B., Schlösser U.W., Melkonian M. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. // Protist 2001. V. 152. № 4. P. 265–300.

Sherwood A.R., Vis M.L., Entwistle T. J. et al. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach // Phycol. Res. 2008. V. 56. № 4. P. 269–279.

Skaloud P., Kalina T., Nemjová K. et al. Morphology and phylogenetic position of the freshwater green microalgae *Chlorochytrium* (Chlorophyceae) and *Scotinosphaera* (Scotinosphaerales, ord. nov., Ulvophyceae) // J. Phycol. 2013. V. 49. № 1. P. 115–129.

Skaloud P., Peksa O. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Mol. Phyl. and Evol. 2010. V. 54. № 1. P. 36–46.

Thüs H., Muggia L., Pérez-Ortega S. et al. Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota) // Eur. J. Phycol. 2011. N. 46. № 4. P. 399–415.

Trainor F.R. The format for a *Scenedesmus* monograph // Algal. Stud. 1991. V. 61. P. 47 – 53.

Trainor F.R., Egan P.F. Discovering the various ecomorphs of *Scenedesmus* // Arch. Protistenk. 1991. V. 139. P. 125–132.

Verbruggen H., De Clerck O., N'Yeurt A.D.R. et al. Phylogeny and taxonomy of *Halimeda incrassata*, including descriptions of *H. kanaloana* and *H. heteromorpha* spp. nov. // Eur. J. Phycol. 2006. V. 41. № 3. P. 337–362.

von Cräutlein M., Korpelainen H., Pietiläinen M., Rikkinen J. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity // Biodiver. Conserv. 2011. V. 20. № 2. P. 373–389.

Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2006a. V. 42. № 3. P. 679–695.

Watanabe S., Tsujimura S., Misono T. et al. *Hemiflagellochloris kazakhstanica* gen. et sp. nov.: a new coccoid green alga with a flagella of considerably unequal lengths from a saline irrigation land in Kazakhstan (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2006b. V. 42. № 3. P. 696–706.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols. San Diego: Acad. Press, 1990. P. 315–322.

Wilson J.J. Assessing the value of DNA barcodes and other priority gene regions for molecular phylogenetics of Lepidoptera // PlosONE. 2010. № 5. P. e10525.

Zhang J., Huss V.A.R., Sun X. et al. Morphology and phylogenetic position of a trebouxioephycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species // Eur. J. Phycol. 2008. V. 43. № 2. P. 185–193.

Zimmermann J., Jahn R., Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18 S rRNA gene, including new primers and protocols // Org. Div. and Evol. 2011. V. 11. № 3. P. 173–192.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МОЛЛЮСКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ

И.С. Ворошилова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок.
E-mail: issergeeva@yandex.ru*

Рассмотрены различные типы генетических маркеров, используемые для идентификации видовой принадлежности моллюсков. Таксономические ключи, основанные на морфологических признаках, не всегда позволяют надежно различать виды моллюсков. В таких случаях в дополнение к морфологическим признакам полезно применять генетические маркеры.

Ключевые слова: ДНК, моллюски, идентификация, вид.

Different types of genetic-markers to discriminate species of mussels are considered. Taxonomic keys based on shell morphology are not always able to differentiate these species with confidence. In such cases genetic markers are useful in addition to morphological features.

Keywords: DNA, mussels, discrimination, species.

Определение видовой принадлежности – необходимый этап при изучении практически всех общебиологических вопросов, поскольку неправильная идентификация может стать причиной ошибочных выводов. Применение молекулярно-генетических маркеров, в дополнение к традиционным методам, позволяет существенно расширить возможности исследователей.

В каких случаях рационально применять генетические методы для идентификации видовой принадлежности моллюсков?

Идентификация по фрагментам тела необходима при изучении популяций редких видов и уникальных образцов. Определение видовой принадлежности обычно проводят путем анализа проб мышечных тканей. При аккуратном отборе материала крупных моллюсков можно вернуть в их естественную среду обитания без потери жизнеспособности особей. В некоторых случаях возможен анализ раковин погибших естественной смертью моллюсков (Geist et al., 2008).

Внутривидовой полиморфизм, тератологическая изменчивость. Определение близкородственных и криптических видов, межвидовых

гибридов. Многие виды моллюсков характеризуются высоким внутривидовым разнообразием по количественным и качественным морфологическим характеристикам (Жадин, 1952). Внутривидовые варианты, существенно отклоняющиеся от типичных для вида особенностей, а также тератологические варианты иногда встречаются при анализе таксономически значимых признаков, таких как форма раковины и детали строения мягкого тела. Даже анализ признаков, непосредственно связанных с формированием репродуктивной изоляции, например индекса копулятивного аппарата, далеко не всегда позволяет однозначно установить видовую принадлежность (Винарский, 2013).

Проблемы идентификации, возникающие в результате полиморфизма, особенно актуальны при изучении близкородственных и криптических видов, образующих симпатрические поселения. Применение генетических методов необходимо для идентификации межвидовых гибридов, поскольку моллюски характеризуются небольшим набором признаков, пригодных для идентификации их видовой принадлежности, в результате гибридные особи могут соответствовать признакам одного из родительских видов.

При изучении симпатрических поселений специалисты предлагают анализировать не отдельных особей, а выборку или даже серии выборок в целом, с использованием статистических методов (Винарский, Андреева, 2007; Винарский, 2013). Если в распоряжении исследователя имеется всего несколько нетипичных особей, видовую принадлежность которых необходимо определить, можно воспользоваться генетическими методами.

Изменения в ходе онтогенеза. Обычно диагностические ключи позволяют определять взрослых моллюсков. Молодые особи часто имеют менее выраженные признаки, а пропорции раковины могут изменяться вследствие аллометрического роста. Нередко определить видовую принадлежность молоди по морфологическим признакам может только специалист, имеющий большой опыт работы с этой группой моллюсков.

Для идентификации личинок выявлены видоспецифические признаки, диагностируемые с использованием сканирующей электронной микроскопии. Тем не менее, далеко не все виды могут быть определены этим методом. Кроме того, идентификация личинок, паразитирующих на жабрах рыб, по морфологическим признакам не всегда возможна, поскольку створки моллюска могут быть деформированы при их очистке от мягких тканей.

Генетические методы и маркеры, применяемые для идентификации видовой принадлежности

Аллозимы. Анализ аллельных вариантов одного и того же локуса, детерминирующих отдельные варианты полипептидной цепи белка (аллозимы), позволяет исследовать полиморфизм кодирующих

последовательностей генов, контролирующих их синтез. Изучение полиморфизма белков проводят с помощью электрофореза в крахмальном и полиакриламидном гелях с последующим гистохимическим окрашиванием. Если представители разных видов различаются наборами аллельных вариантов по отдельным локусам, то аллозимы можно применять в качестве маркеров для идентификации видовой принадлежности особей, подтверждения гибридного происхождения. Метод позволяет разграничивать близкие виды и виды-двойники. С помощью этих маркеров подтверждено существование гибридных особей *D. bugensis*х*D. polymorpha* (Ворошилова и др., 2010). Наряду с другими генетическими маркерами аллозимы успешно применяют для изучения микроэволюционных процессов в симпатрических поселениях близкородственных видов мидий, литторин, унионид и ряда видов наземных моллюсков.

Анализ анонимных последовательностей (методы RAPD, AFLP, ISSR) в настоящее время сравнительно редко проводят для идентификации видовой принадлежности моллюсков. В настоящее время эти методы используют для поиска видоспецифичных участков генома и создания праймеров, позволяющих идентифицировать видовую принадлежность особей и исследовать межвидовую гибридизацию (Михайлова, 2012).

В последние годы наиболее часто используют маркеры, разработанные на основе известных последовательностей ДНК, которые синтезируются с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать исследуемый фрагмент ядерной или митохондриальной ДНК.

Генетический баркодинг (ДНК-баркодинг, ДНК-штрихкодирование) – это метод, в основе которого лежит использование коротких генетических маркеров для определения таксономического положения организма. Метод предложен в 2003 году канадским ученым Полом Хебертом (Hebert, 2003). В 2004 году был основан международный консорциум «Штрихкод жизни» (Consortium for the Barcode of Life, CBOL). Баркодинг предполагает создание библиотеки ДНК-штрихкодов эталонных участков генома. Для идентификации видовой принадлежности моллюсков этим методом используют преимущественно нуклеотидные последовательности митохондриальных генов (COI, 16S, cyt b).

Нуклеотидные последовательности имеют характерные межвидовые различия в определенных участках митохондриальной или ядерной ДНК. Это могут быть как однонуклеотидные замены (маркеры SNP), так и мутационные изменения небольших участков ДНК. Анализ видоспецифических сайтов позволяет существенно снизить затраты на проведение исследования и при необходимости автоматизировать методы детекции с использованием современных технологий тестирования SNP,

которые сейчас очень интенсивно развиваются (Сулимова, 2004; Sobrino et al., 2005). Из наиболее простых способов детекции, доступных практически в каждой генетической лаборатории, можно отметить *видоспецифическую, аллель-специфическую ПЦР и анализ ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)*.

Свойства маркеров

Маркеры митохондриальной ДНК. Для митохондриальной ДНК характерно последовательное накопление мутаций, что позволяет определить происхождение и степень дифференциации межвидовых вариантов нуклеотидных последовательностей ДНК. Кроме того, в международной базе данных NCBI для большинства видов моллюсков число митохондриальных нуклеотидных последовательностей ДНК гораздо больше, чем ядерных. Следовательно, внутривидовой полиморфизм митохондриальных генов изучен лучше, а значит, маркеры мтДНК в целом более надежны для идентификации видовой принадлежности особей. Тем не менее, существуют проблемы, которые необходимо учитывать при их применении:

- Небольшие различия между внутривидовыми и межвидовыми вариантами нуклеотидных последовательностей могут стать источником проблем при идентификации эволюционно молодых видов, а также таксонов с низкой скоростью эволюции.

- Псевдогены. Если учитывать всё разнообразие псевдо-последовательностей, то по ошибке можно описать несуществующие виды организмов.

- Двойное наследование митохондриальной ДНК (наличие мужского и женского вариантов мтДНК).

- Межвидовая гибридизация. Митохондриальная ДНК наследуется преимущественно по материнской линии, поэтому митохондриальные маркеры не позволяют идентифицировать межвидовых гибридов.

Тандемно повторяющиеся последовательности ядерной ДНК. Гены рибосомальной РНК и межгенные спейсеры ITS совместно с митохондриальными генами наиболее часто используются в филогенетических исследованиях (обзор: Hillis, Dixon, 1991).

Постепенно накапливаются сведения о полиморфизме тандемно повторяющихся последовательностей ядерной ДНК. Точность идентификации во многом зависит от того, насколько тщательно проведено тестирование на предмет выявления внутривидовых вариантов, снижающих диагностическую значимость маркеров. К примеру, на основе нуклеотидной последовательности гена 28S РНК разработаны видоспецифические праймеры для идентификации *Dreissena polymorpha* и *Dreissena bugensis* (Hoy et al., 2010). Предполагается, что нуклеотидные последовательности ядерных генов консервативны, но для

D. polymorpha известны два существенно различающихся внутривидовых варианта 28S РНК, обозначенные авторами как типы А и В (Park, O' Foighil, 2000). Участки ДНК, на которых происходит отжиг праймераодного из вариантов *Dreissena polymorpha* (тип А) и *Dreissena bugensis* идентичны. Следовательно, такие особи *D. polymorpha* могут быть ошибочно идентифицированы как *D. bugensis*. Результаты практической проверки этого метода при его совместном использовании с морфологическим анализом и ПЦР-ПДРФ мтДНК подтвердили это предположение.

Уникальные гены в настоящее время редко используют для идентификации моллюсков, поскольку для большинства видов моллюсков еще не разработаны универсальные праймеры, позволяющие амплифицировать фрагменты уникальных генов (Plazzi, Passamonti, 2010).

При выборе метода и маркеров для идентификации следует учитывать, что определение моллюсков на разных стадиях жизненного цикла имеет свои особенности. Праймеры для идентификации видовой принадлежности моллюсков в большинстве случаев отжигаются на консервативных участках митохондриальных и ядерных генов, сходных у различных групп беспозвоночных животных. Для определения личинок используют фрагменты генов COI (Gustafson, Iwamoto, 2005; Boyer et al., 2011), ND1 (Kneeland, Rhymer, 2007; Kneeland, Rhymer, 2008; Boyer et al., 2011), 12S РНК (White et al., 1996), 16S РНК (McCartney et al., 2009), и межгенные спейсеры ITS (White et al., 1994; White et al., 1996; Gerke, Tiedemann 2001; Kong et al., 2002; Kallersjo et al., 2005; Zieritz et al., 2012). Поскольку в пробах жабр рыб могут присутствовать ткани паразитических и свободно живущих беспозвоночных, исследователи рекомендуют выделять ДНК из глохидия, отделенного от жабр рыб (White et al., 1996; Gerke, Tiedemann 2001; Gustafson, Iwamoto, 2005; Kneeland, Rhymer, 2007; Zieritz et al., 2012).

В заключение следует отметить, что для идентификации видовой принадлежности моллюсков необходимо в полной мере использовать возможности морфологических методов, которые позволяют при существенно меньших финансовых затратах анализировать массовый материал. Генетические методы идентификации видовой принадлежности моллюсков необходимы для решения тех вопросов, которые по разным причинам не удается решить с помощью морфологического подхода. Перспективным направлением может стать отбор наиболее надежных диагностических морфологических признаков, осуществляемый в ходе исследования, включающего морфологический и генетический анализ (Voroshilova, 2013).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант – 14-04-00213 - А, 12-04-00594-а, 14-04-31112 - мол_а) и МК-2455.2013.4.

Список литературы

Винарский М.В. Изменчивость пресноводных легочных моллюсков (таксономический аспект). Омск: Изд-во ОмГПУ, 2013. 266 с.

Винарский М.В., Андреева С.И. К вопросу о виде у пресноводных моллюсков: история и современность / Теорет. и практ. проблемы изучения сообществ бесп.: памяти Я.И. Старобогатова. М.: Тов. науч. изд. КМК, 2007. С. 130–147.

Ворошилова И.С., Артамонова В.С., Махров А.А., Слынько Ю.В. Гибридизация двух видов дрейссен *Dreissenapolyomorpha* (Pallas, 1771) и *Dreissenabugensis*(Andrusov, 1897) в естественных условиях // Известия РАН. Серия биологическая. 2010. № 5. С.631–636.

Жадин В.И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. М.: Изд-во АН СССР, 1952. 376 с.

Михайлова Н.А. Комплекс криптических видов литоральных гастропод подрода *Neitrema* (Littorinidae:Littorina) Северной Атлантики: сравнительная морфология, филогения, эволюция. Автореф. дисс. доктора биол. наук. Санкт-Петербург: Институт цитологии РАН. 2012. 40 с.

Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи совр. биологии. 2004. Т.124. № 3. С. 260–271.

Boyer S.L., Howe A.A., Juergens N.W., Hove M.C. A DNA-barcoding approach to identifying juvenile freshwater mussels (Bivalvia:Unionidae) recovered from naturally infested fishes // J. North Am. Benthol. Soc. 2011. V. 30. P. 182–194.

Geist J., Wunderlich H., Kuehn R. Use of mollusk shells for DNA-based molecular analyses // Journal of Molluscan Studies. 2008. V. 74. P. 337–343.

Gerke N., Tiedemann R. A PCR-based molecular identification key to the glochidia of European freshwater mussels (Unionidae) // Conserv. Genet. 2001. V. 2. P. 287–289.

Gustafson R.G., Iwamoto E.M. A DNA-based identification key to pacific northwest freshwater mussel glochidia: importance to salmonid and mussel conservation // Northwest Sci. 2005. V. 79. P. 233–245.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Shelley L. Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. Lond. 2003. V. 270. P. 313–321.

Hillis D.M., Dixon M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference // The Quarterly Review of Biology. 1991. V. 66. № 4. P. 411–453.

Hoy M.S., Kelly K., Rodriguez R.J. Development of a molecular diagnostic system to discriminate *Dreissena polymorpha* (zebra mussel) and *Dreissena bugensis* (quagga mussel) // Mol. Ecol. Resources. 2010. V. 10. P. 190–192.

Kallersjo M., von Proschwitz T., Lundberg S., Eldenas P., Erseus C. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe // Zoologica Scripta. 2005. V.34. P. 415–424.

Kneeland S.C., Rhymer J.M. A molecular identification key for freshwater mussel glochidia encysted on naturally parasitized fish hosts in Maine, USA // J. Molluscan Stud. 2007. V. 73. P. 279–282.

Kneeland S.C., Rhymer J.M. Determination of fish host use by wild populations of rare freshwater mussels using a molecular identification key to identify-glochidia // J. North Am. Benthol. Soc. 2008. V. 27. P. 150–160.

Kong X. Y., Zhang L. S., Yu Z. N., Liu Y. J., Wang Q. Y. Sequence of ribosomal internal transcribed spacer regions and mitochondrial gene fragments in *Crassostrea gigas* // J. Fishery Sci. China. 2002. V. 9. P. 4304–4308.

McCartney M.A., Sommer K., Wilbur A.E. Field evaluation of mortality from hemolymph extraction as a source of DNA, and application to PCR-RFLP identification of threatened freshwater mussel species // J. Shellfish Res. 2009. V. 28. P. 345–354.

Park J.K., O' Foighil D. Sphaeriid and corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2000. V.14. P. 75–88.

Plazzi F., Passamonti M. Towards a molecular phylogeny of Mollusks: Bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes //Molecular Phylogenetics and Evolution. 2010. V. 57. P. 641–657.

Sobrinho B., M. Brion M., Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies // Forensic Sci. Int., 2005. V. 154. № 2-3. P. 181–94.

Voroshilova I.S. Invasive species of dreissenid mussels: their morphological variability and genetic identification // Invasion of alien species in Holarctic. International symposium Borok- IV, September 22-28. Programme & Book of Abstracts., Yaroslavl. 2013. P. 183.

White L.R., McPheron B.A., Stauffer J.R. Identification of fresh-water mussel glochidia on host fishes using restriction-fragment-length polymorphisms // Mol. Ecol. 1994. V. 3. P. 183–185.

White L. R., McPheron B. A., Stauffer J. R. Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania // Malacologia. 1996. V. 38. P. 181–202.

Zieritz A., Gum B., Kuehn R., Geist J. Identifying freshwater mussels (Unionoida) and parasitic glochidia larvae from host fish gills: a molecular key to the North and Central European species // Ecol. and Evol. 2012. V. 2. № 4. P. 740–750.

УДК 612.017.12

ПРОБЛЕМЫ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН

М.С. Юркова

*АО ВНИЦ Молекулярная диагностика и лечение
117638 г. Москва, Симферопольский пр.8
E-mail: maria_yurkova@hotmail.com*

В работе представлены результаты исследования структуры белка E2 оболочки вируса гепатита С, предваряющие работу над потенциальной вакциной. Сложности в создании вакцины против ВГС обусловлены трудностями в работе с вирусными белками, в том числе белка E2 ввиду их нестандартных свойств. Поведение рекомбинантного E2 на электрофорезе в градиенте мочевины оказалось не типичным – его денатурация и ренатурация происходят плавно и постепенно, не демонстрируя кооперативности и не образуя точки перехода из одного состояния в другое. Подключение подходов ограниченного протеолиза и иммуноблоттинга позволило установить, что основная часть recE2 состоит из 4 доменов.

Ключевые слова: вакцина, гепатит С, белок recE2, карбоксиметилирование, ограниченный протеолиз, антитела

Work presents the results of investigation of the protein E2 - structure from the hepatitis C virus shell, which anticipate the work with the potential vaccine. Complexities in the creation of vaccine against VGC are caused by difficulties in the work with the virus proteins, including of the protein E2 in view of their nonstandard properties. The behavior of recE2 in electrophoresis in PAG with the gradient of urea was not typical - its denaturation and renaturation occur smoothly and gradually, without cooperativity and transition point from one state to another. The connection of the approaches of the limited proteolysis and immunoblotting made it possible to establish that major part of recE2 consists of 4 domains.

Keywords: creation of vaccines, hepatitis C virus, recE2

Цель данного доклада – ознакомить аудиторию с методами, процессом и результатами конкретной работы по изучению белка оболочки вируса гепатита С. Гепатит С чаще всего представляет собой

хроническую инфекцию, которая приводит к хроническому гепатиту, циррозу печени и гепатоцеллюлярной карциноме у 20-30% больных. Статистические данные по России – около 3 – 5% населения страдают от хронического гепатита С. Проблема не решена в мировом масштабе, поскольку против гепатита С не существует вакцины, а для больных проводится неспецифическая анти-вирусная терапия. Очевидно, что имеется настоятельная потребность в превентивной, а лучше терапевтической, вакцине, и многие научные лаборатории и даже специально созданные центры занимались этой проблемой.

Вирус гепатита С (ВГС) является оболочечным вирусом, геном которого (+РНК) кодирует единый полипротеин, который подвергается процессингу под действием протеаз вируса и хозяина, образуя структурные и неструктурные вирусные белки.

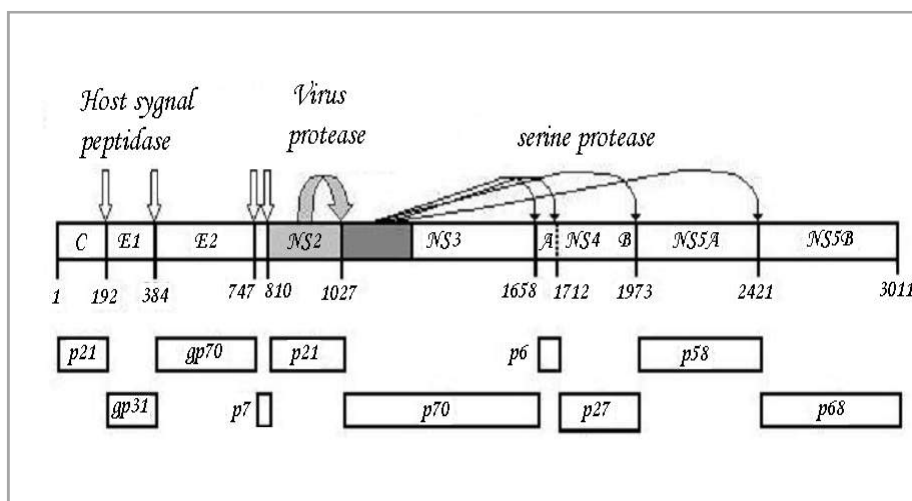


Рис. 1. Процессинг вирусного пептида.

В качестве одного из основных кандидатов на создание анти-ВГС вакцины рассматривали гликопротеин E2, входящий в состав оболочки вируса (аминокислоты полипротеина с 385 до 746). Этот белок взаимодействует с предполагаемым клеточным рецептором ВГС, CD81, против него вырабатываются (если это случается) нейтрализующие антитела, а также он играет значительную роль в морфогенезе вируса. Все это послужило основанием для более подробного его изучения.

Поскольку E2 является гликопротеином, предыдущие работы обращались к анализу его гликозилированных форм, которые обладают иммуногенной активностью только в том случае, если E2 подвергался специфическому кор-гликозилированию внутри человеческих или животных клеток; полностью гликозилированный и секретируемый

белок антигеном практически не является. Получение кор-гликозилированных форм очень дорого, поскольку требует использования культур животных клеток и последующей очистки из органелл (аппарата Гольджи). Информация о структуре E2 получена не была, отчасти из-за того, что этот белок очень сложен для биохимической работы, отчасти из-за того, что гетерогенное гликозилирование вносит дополнительные трудности в определение структуры. На фоне приведенных литературных данных мы начали работу с белком E2.

Нами было показано, что полученный в бактериальных клетках негликозилированный E2 функционален, а именно способен взаимодействовать со специфическим клеточным рецептором CD81 и анти-E2 моноклональными антителами.

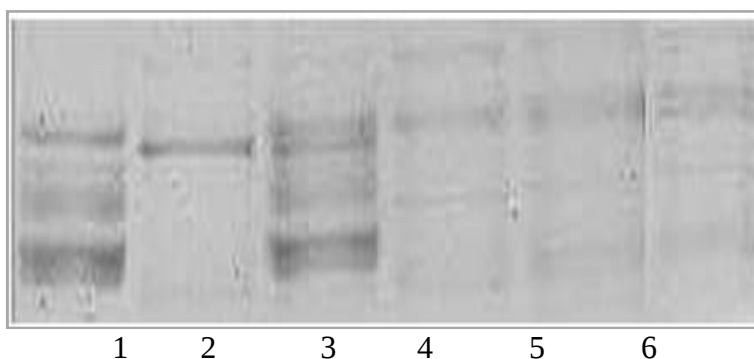


Рис. 2. Взаимодействие рекомбинантного E2 с рецептором CD81. 1 – очищенный CD81; 2 – очищенный E2; 3 – очищенный CD81 + очищенный E2; 4, 5 и 6 – последовательные элюции комплекса CD81+E2 с Ni-сефарозы. Диск-электрофорез в градиентном геле (10 – 20%).

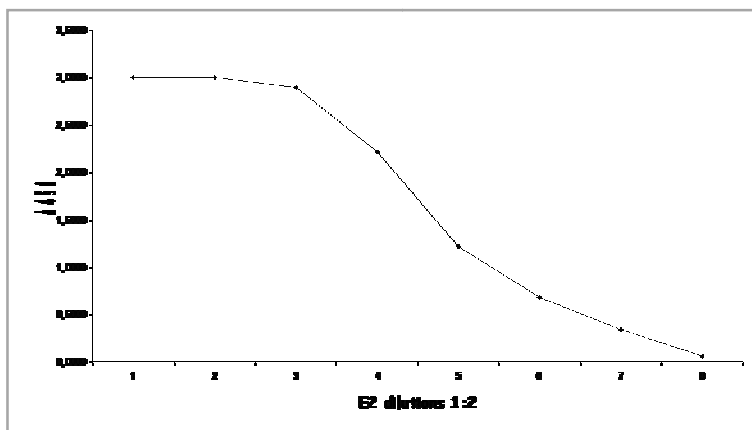


Рис. 3. Взаимодействие иммобилизованного мономера рекомбинантного E2 с анти-E2 моноклональными антителами (AP33).

В рекомбинантном E2, как следует из аминокислотной последовательности, имеется 17 SH-групп. Как правило, в правильно ренатурированном белке SH-группы замкнуты попарно в дисульфидные связи. Для того, чтобы оценить, замкнуты ли дисульфидные связи в полученном нами препарате белка, мы сравнили количество свободных SH-групп в гесE2 после рефолдинга и в гесE2, в котором SH-группы восстановлены методом Элмана. Общее количество SH-групп в восстановленном гесE2 составляло 6 нМ в образце, в то время, как в белке после рефолдинга количество SH-групп было менее 0.5 нМ. Соотнесение полученных результатов с количеством белка в образце (0.38 нМ) показывает, что метод дает адекватные результаты (15-17 SH-групп на молекулу), и что большинство SH-групп в ренатурированном гесE2 находятся в окисленной форме, т.е. они вовлечены в формирование дисульфидных связей.

Чтобы подтвердить сделанный вывод, мы проанализировали статус цистеиновых остатков с помощью метода двойного карбоксиметилирования. Метод заключается в том, что SH-группы нативного белка модифицируют с помощью йод-уксусной кислоты (IAA), после чего все оставшиеся дисульфидные связи восстанавливают и модифицируют новообразованные SH-группы йодацетамидом (IAM). Первичная модификация йод-уксусной кислотой происходит только с восстановленными свободными SH-группами и не затрагивает S-S связи. После восстановления дисульфидных связей соответствующие цистеиновые остатки становятся доступными для дальнейшей модификации с помощью йодацетамида. В то время как йодацетамид сам по себе нейтрален и не изменяет заряд модифицированного белка, присоединение йод-уксусной кислоты добавляет на SH-группу белка один отрицательный заряд. Изменение суммарного заряда белка позволяет вычислить количество цистеиновых остатков, вовлеченных в формирование дисульфидных связей. Подобный анализ был проведен с иммобилизованным гесE2, изменение заряда белка определяли по электрофорезу в 8 М мочеvine без SDS. Полученные результаты свидетельствуют о том, что большая часть цистеиновых остатков гесE2 не доступны для первичного карбоксиметилирования йод-уксусной кислотой и могут быть модифицированы йодацетамидом после восстановления S-S связей. Следовательно, большинство остатков цистеина в гесE2 вовлечены в формирование дисульфидных связей.

Взаимодействие со специфическими для природного E2 молекулами обозначает сохранение нативной структуры в рекомбинантном E2. Поэтому мы применили доступные способы описания структуры к рекомбинантному E2. Например, электрофорез в градиенте мочеvine дает общее (описательное) представление о структуре белка, кооперативности и силе внутримолекулярных взаимодействий (Рис. 4).

Поведение рекомбинантного E2 на электрофорезе в градиенте мочевины совершенно не типично – его денатурация и ренатурация происходят плавно и постепенно, не демонстрируя кооперативности и не образуя точки перехода из одного состояния в другое.

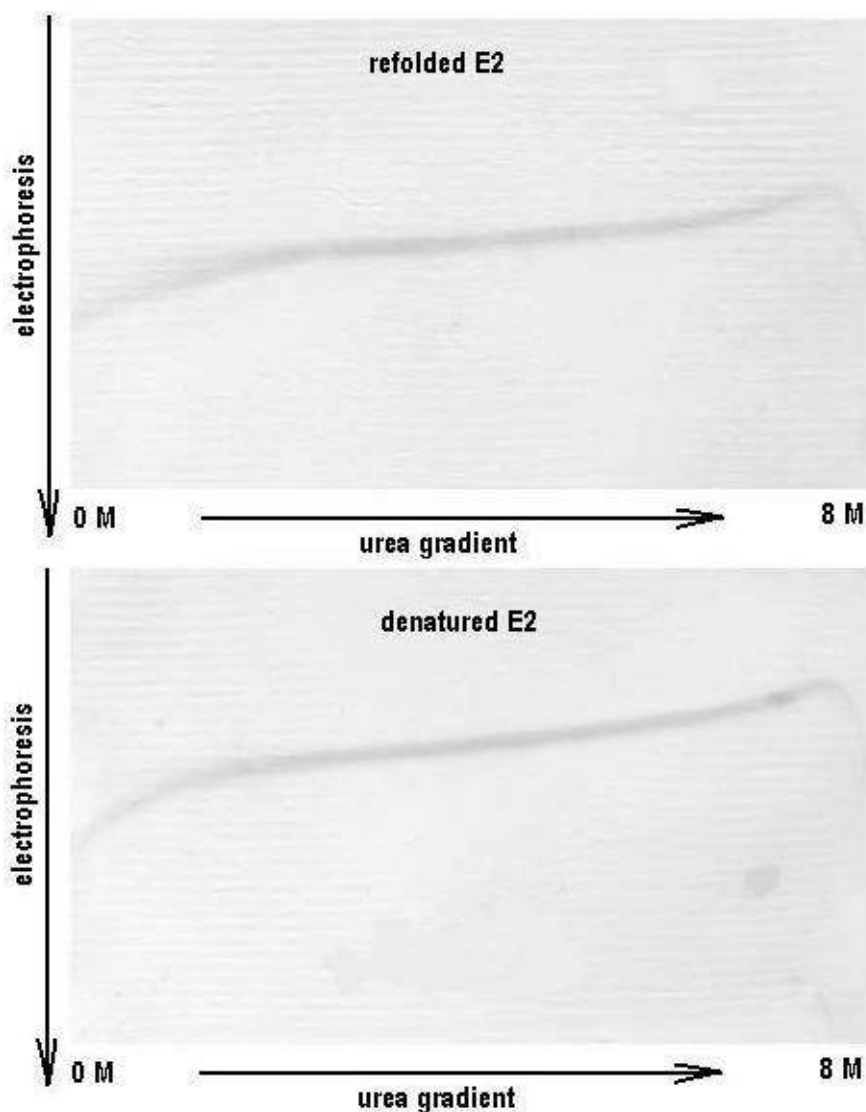


Рис. 4. Анализ растворимого мономера E2 с помощью электрофореза в градиенте мочевины.

Еще один подход, позволяющий косвенно судить об общей организации третичной структуры белка – ограниченный протеолиз. Этот метод используется в тех случаях, когда другие методы не могут быть применены. Протеолизу в первую очередь подвергаются аминокислотные

остатки, расположенные на поверхности полипептида, в то время как аминокислотные остатки, спрятанные внутри, более устойчивы к протеолизу. Также более устойчивыми являются остатки, вовлеченные в формирование жестких структур в белке, по сравнению с аминокислотными остатками неструктурированных участков. Для наибольшей информативности, после проведения протеолиза необходимо идентифицировать полученные пептиды. Таким образом, основываясь на известной аминокислотной последовательности полипептида (и, соответственно, расположении потенциальных сайтов протеолиза), а также на данных, в какой очередности появляются протеолитические фрагменты, можно сделать предположения об общей компактности белка, и о структуре его отдельных участков.

В последовательности E2 есть 20 сайтов для гидролиза трипсином – остатков аргинина и лизина. Нами были подобраны условия (концентрация трипсина и время деградации) для ограниченного протеолиза гесE2. Образцы отбирались в течение всего протеолиза (до 90 минут) и затем анализировались с помощью электрофореза и последующего иммуноблота с различными антителами к E2. Пептиды идентифицировали, учитывая их молекулярную массу, а также данные по связыванию со специфичными антителами к известным эпитопам E2.

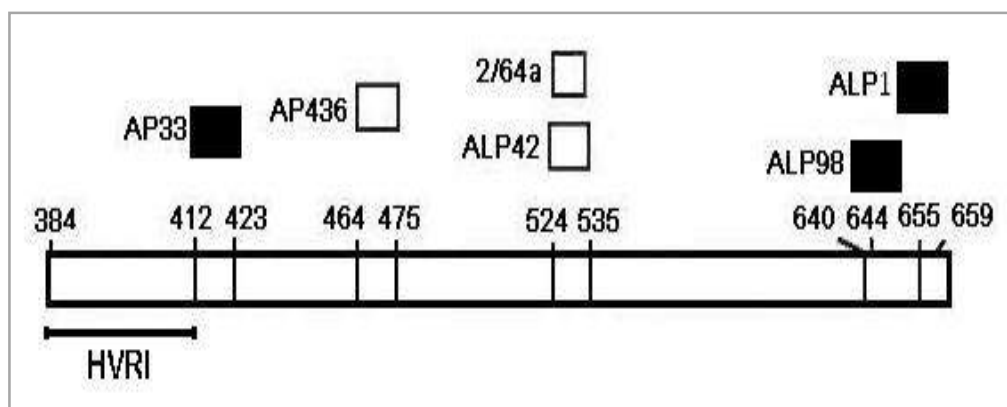


Рис. 5. Карта эпитопов E2, распознаваемых моноклональными антителами. Эпитопы антител, использованных в этой работе, отмечены черным.

Полученные результаты свидетельствуют, что N-концевая часть гесE2, HVR1 (384-410 аминокислотные остатки), подвергается немедленной деградации при добавлении трипсина (Рис. 6А), и, следовательно, этот участок гесE2 не имеет жесткой структуры. Это следует из анализа продуктов протеолиза с использованием анти-HVR1 кроличьей поликлональной антисыворотки, где не детектируется никаких продуктов протеолиза сразу после добавления трипсина.

С-концевая часть гесЕ2 (651-663 аминокислотные остатки), по-видимому, тоже является неструктурированной. Об этом свидетельствует тот факт, что моноклональные антитела ALP1, узнающие фрагмент с 650 по 659 аминокислотные остатки, перестают детектировать гесЕ2 и его фрагменты вскоре после начала протеолиза (Рис. 6Б). В то же время, антитела ALP98 (644-655 аминокислотные остатки), узнающие фрагмент, частично перекрывающийся с эпитопом ALP1, продолжают узнавать стабильные фрагменты с молекулярной массой 21.4 кДа и 14.3 кДа даже после окончания протеолиза (Рис. 6С).

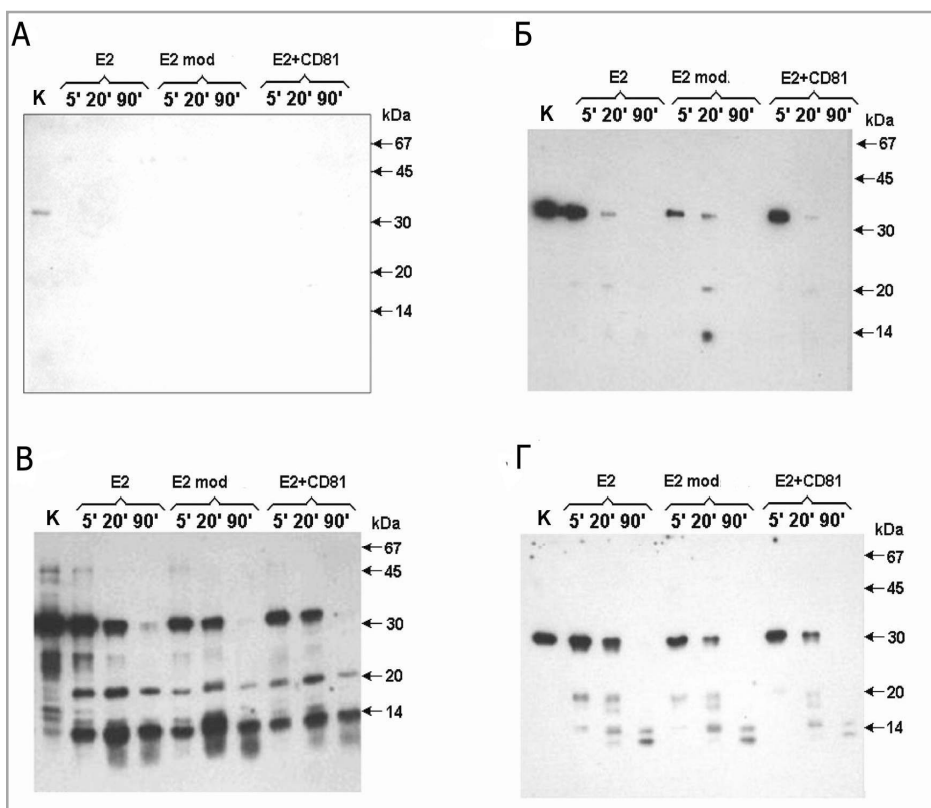


Рис. 6. Трипсинолиз гесЕ2, детекция с различными антителами к Е2. А – кроличья поликлональная антисыворотка к HVRI (N-конец); Б – антитела ALP1 (С-конец); В – антитела ALP98; Г – антитела AP33. Для всех панелей – К (контроль) – гесЕ2 до трипсинолиза; далее 3 дорожки (Е2) показывают временные точки трипсинолиза гесЕ2; следующие 3 дорожки (Е2mod) представляют те же временные точки трипсинолиза гесЕ2, в котором –SH группы сначала полностью восстановили, затем карбоксиметилировали; 3 завершающие дорожки (Е2+CD81) представляют временные точки трипсинолиза гесЕ2 в комплексе с CD81.

Интересные результаты были получены при использовании антител на центральную часть E2, AP33 (412-423 аминокислотные остатки) и ALP98 (644-655 аминокислотные остатки). Результаты протеолиза представлены на Рис. 6В и 6Г, и схематически представлены на Рис. 7. В начале протеолиза антитела AP33 узнают большой промежуточный фрагмент размером 21.4 кДа, соответствующий, по-видимому, 411-606 аминокислотным остаткам, а также минорный фрагмент 16.7 кДа (411-562). Позднее появляется промежуточный фрагмент 19.4 кДа (411-587). Этот пептид может являться результатом гидролиза 21.4 кДа фрагмента по соседствующим сайтам Arg 587 и Lys 588. Два фрагмента, 16.8 и 12.1 кДа, детектируются в конце протеолиза и представляют собой продукты последовательного гидролиза исходного фрагмента 21.4 кДа по сайтам Lys 562 и Arg 521 соответственно. Необходимо отметить, что в фрагменте 411-521 присутствуют еще 3 потенциальных сайта трипсинолиза, по всей видимости, они не доступны действию трипсина. Нам не удалось детектировать фрагмент, соответствующий 411-648 аминокислотным остаткам, это, по всей видимости, означает, что гидролиз по сайту Arg 648 происходит практически сразу после добавления трипсина.

В начале протеолиза антитела ALP98 детектируют 2 мажорных фрагмента 21.6 и 14.3 кДа, соответствующие 456-648 и 522-648 аминокислотным остаткам. Оба фрагмента детектируются в смеси практически до окончания протеолиза. В конце трипсинолиза в смеси остается фрагмент 14.3 кДа, а также пептид меньшей молекулярной массы, возможно, продукт его протеолиза. Фрагменты 21.6 и 14.3 кДа несут 11 и 10 потенциальных сайтов для трипсина соответственно, включая Arg 606. Эти данные могут означать, что эти сайты слабо доступны протеиназе за счет жесткой структуры на С-конце белка гесЕ2.

На основании полученных результатов мы предполагаем, что в белке гесЕ2 существует два альтернативных пути протеолиза (Рис.7).

Следует напомнить, что сначала проходит гидролиз N-концевой части белка по Lys 410 и С-концевой части по Arg 648 и Arg 651. Первичный гидролиз центральной части, по-видимому, проходит или по сайту Arg 455, или Arg 606. В случае, если гидролиз прошел по Arg 606, то сайт Arg 455 становится недоступным для трипсина. Тогда дальнейший протеолиз проходит по сайтам 588, 521 и 562, в смеси накапливаются стабильные фрагменты 411-521 (12.1 кДа) и 411-562 (16.8 кДа). При гидролизе по Arg 455, доступность Arg 606 для трипсина значительно уменьшается, гидролиз происходит преимущественно по сайту Arg 521, и в результате мы можем детектировать в смеси фрагменты 456-648 (21.6 кДа) и 522-648 (14.3 кДа). Можно предположить, что области белка E2, которые окружают аминокислотные остатки Arg 455 и Arg 606, являются менее структурированными, чем полноразмерный белок.

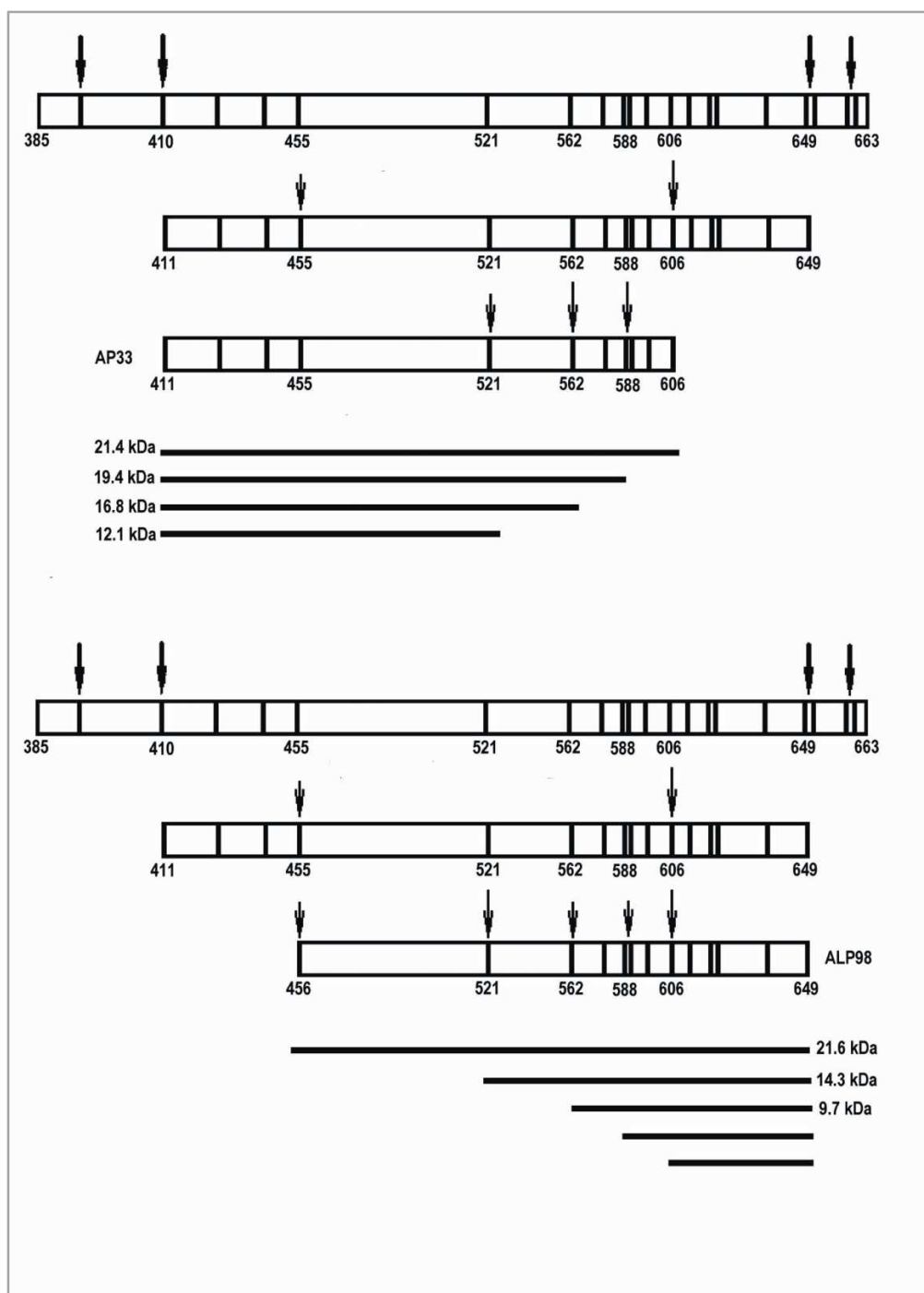


Рис. 7. Схема трипсинолиза gesE2. Представлены два альтернативных пути трипсинолиза: А – фрагменты, детектируемые антителами AP33; Б – фрагменты, детектируемые антителами ALP98.

Однако, при гидролизе по одному из указанных сайтов, в получающемся фрагменте 411-606 или 456-648 структура по соседству с Arg 455 и Arg 606 становится более жесткой, и эти сайты становятся менее доступными для трипсина. Мы предполагаем, что такие изменения в структуре отражают взаимодействие соответствующих регионов в гесЕ2: 411-456 и 607-648, и гидролиз в одном из этих регионов приводит к изменениям структуры другого региона гесЕ2.

Результаты позволяют предположить, что основная часть гесЕ2 (411-648 аминокислотные остатки) состоит из 4 доменов: 411-455, 456-562, 563-606 и 607-648 аминокислотные остатки, и первый домен взаимодействует с четвертым.

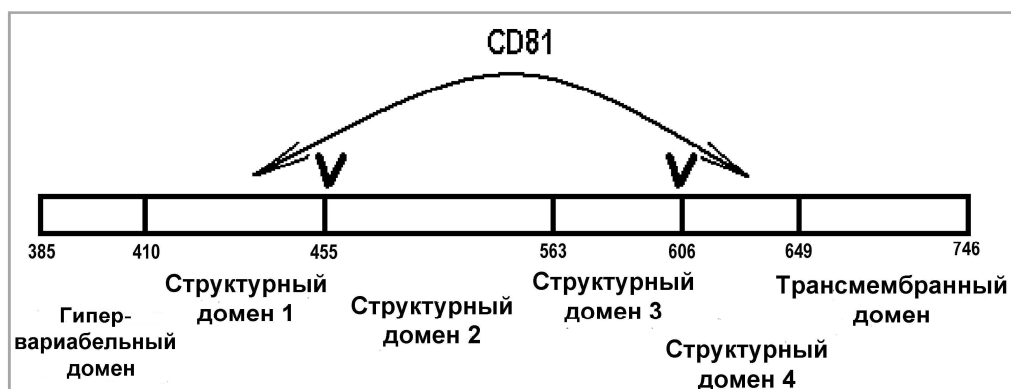


Рис. 8. Схема доменной организации Е2.

Анализ результатов, полученных при изучении протеолиза гесЕ2 с различными антителами, позволил нам предположить, какие сайты легко доступны действию трипсина, и, следовательно, расположены на поверхности белка гесЕ2, это Arg390, Lys410, Arg455, Arg606, Arg648/651 и Arg657/659.

В этой работе мы также исследовали роль дисульфидных связей в поддержании структуры гесЕ2. Мы проводили восстановление SH-групп в иммобилизованном гесЕ2 и обратимо модифицировали их с помощью IAM. Полученный препарат гесЕ2 (Е2mod) был подвергнут трипсинолизу и проанализирован, как описано выше. Сравнительный анализ показал, что восстановление S-S связей не приводит к значительным изменениям в картине трипсинолиза гесЕ2 (Рис. 6, дорожки 5 – 7 на каждой панели). Те остатки лизина и аргинина, которые в гесЕ2 не подвергаются трипсинолизу, остаются таковыми и в модифицированном гесЕ2. По-видимому, S-S связи не вовлечены в стабилизацию структуры гесЕ2, по крайней мере, в тех областях, которые подвергаются протеолизу.

Для того чтобы оценить, есть ли разница в структуре иммобилизованного гесЕ2, и гесЕ2 в комплексе с рецептором CD81, мы провели гидролиз трипсином комплекса гесЕ2-CD81 (Рис. 6, дорожки 8 – 10 на каждой панели). Результаты протеолиза гесЕ2 в таком комплексе, полученные с антителами на HVR1 (385-410) и антителами ALP1 (650-659), демонстрируют быстрый гидролиз соответствующих частей гесЕ2, как и в случае одиночного гесЕ2. Также мы проанализировали результаты гидролиза комплекса гесЕ2-CD81 с антителами AP33 и ALP98, что позволило нам проследить гидролиз центральной части гесЕ2. Анализ С-концевых фрагментов с использованием антител ALP98 показал, что набор идентифицируемых фрагментов, а также их количество не изменились по сравнению с интактным гесЕ2 (Рис. 6В). Однако анализ получившихся фрагментов с помощью антител AP33 указывает на то, что в случае комплекса гесЕ2-CD81 в начале гидролиза образуется меньше исходного фрагмента 21.4 кДа, чем гесЕ2, хотя набор фрагментов, получающихся в результате гидролиза, не отличается от такового у гесЕ2 (Рис. 6 Г). Гипотеза о существовании двух альтернативных путей протеолиза в гесЕ2 помогает в анализе полученных результатов. Как уже указывалось выше, гидролиз основной части гесЕ2 происходит в позиции Arg 455 или Arg 606. Гидролиз по сайту Arg 455 приводит к образованию С-концевого фрагмента 21.6 кДа и инициирует далее первый путь протеолиза; N-концевой фрагмент 21.4 кДа, инициирующий второй путь протеолиза, получается при гидролизе основной части гесЕ2 по сайту Arg 606. Тот факт, что набор и количество С-концевых фрагментов (начиная с первичного 21.6 кДа фрагмента), детектируемых с антителами ALP98, практически не меняется, свидетельствует о том, что начальный гидролиз по сайту Arg 455 происходит с одинаковой эффективностью в интактном гесЕ2 и в составе комплекса гесЕ2-CD81. В то же время, количество N-концевого фрагмента 21.4 кДа существенно уменьшается, следовательно гидролиз Arg 606, приводящий к образованию такого фрагмента, становится более защищенным от протеолиза в комплексе гесЕ2-CD81. В результате, происходит перераспределение двух путей протеолиза. Вероятно, в комплексе гесЕ2-CD81 медленнее происходит первичный гидролиз в положении Arg 606. Таким образом, в комплексе гесЕ2-CD81 Arg 606 становится более защищенным от действия трипсина, чем в интактном гесЕ2, следовательно, рецептор CD81 может находиться в непосредственном контакте с областью, поблизости от Arg 606, т.е. с соответствующими частями доменов 3 и 4.

Многие исследователи считают, что сайт связывания CD81 в белке Е2 имеет сложную структуру и включает в себя несколько участков исследуемого белка. Результаты, полученные в этой работе, а также в предыдущих исследованиях, дополняют друг друга и помогают

прояснить наше понимание взаимодействия E2 и CD81. Полученные нами результаты также могут свидетельствовать о том, что связывание с CD81 не приводит к значительным конформационным изменениям в E2; однако структура некоторых регионов становится менее жесткой, что выражается в некотором увеличении чувствительности к трипсинолизу.

Биохимическое изучение вирусных белков является необходимой стадией, предваряющей работу над потенциальной вакциной. Для белков вируса гепатита С эта предварительная работа до сих пор так и не завершена, этими белками занимается все меньше лабораторий, и, соответственно, вакцины против ВГС нет. Это объясняется, разумеется, вышеописанными трудностями в работе с белками ВГС (не только E2, но и другими), а также их нестандартными свойствами – как, например, поведение на электрофорезе в градиенте мочевины – которые так и не получают объяснения доступными методами.

Список литературы

Федоров А.Н., Юркова М. С. и Лауринавичюте Д.К. Начальный структурный и функциональный анализ иммобилизованного recE2, белка оболочки вируса гепатита С // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2007. Т. 3. С. 20–26.

Brazzoli M., Helenius A., Fong S.K., Houghton M., Abrignani S., Merola M. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells // Virology. 2005. V. 332. № 1. P. 438–453.

Clayton R.F., Owsianka A., Aitken J., Graham S., Bhella D., Patel A.H. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles // J. Virol. 2002. V. 76. P. 7672–7682.

Cramp M.E., Carucci P., Rossol S., Chokshi S., Maertens G., Williams R., Naoumov N.V. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia // GUT. 1999. V. 44. № 3. P. 424–429.

Deleersnyder V., Pillez A., Wychowski C., Blight K., Xu J., Hahn Y.S., Rice C.M., Dubuisson J. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes // J. Virol. 1997. V. 71. P. 697–704.

Dubuisson J., Hsu H.H., Cheung R.C., Greenberg H.B., Russell D.G., Rice C.M. Formation and intracellular-localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sindbis viruses // J. Virol. 1994. V. 68. P. 6147–6160.

Flint M., Maidens C., Loomis-Price L.D., Shotton C., Dubuisson J., Monk P., Higginbottom A., Levy S., McKeating J.A. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81 // J. Virol. 1999. V. 73. P. 6235–6244.

Heile J.M., Fong Y.-L., Rosa D., Berger K., Saletti G., Campagnoli S., Bensi G., Capo S., Coates S., Crawford K., Dong C., Wininger M., Baker G., Cousens L., Chien D., Ng P., Archangel P., Grandi G., Houghton M., Abrignani S. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained

recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 6885–6892.

Houghton, M. Fields Virology, 3rd edn, Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996. P. 1035–1058.

Lee J. W., Kim K., Jung S. H., Lee K. J., Choi E. C., Sung Y. C., Kang C. Y. Identification of a domain containing B-cell epitopes in hepatitis C virus E2 glycoprotein by using mouse monoclonal antibodies // *J. Virol.* 1999. V. 73. № 1. P. 11–18.

Op De Beek A., Cocquerel L., Dubuisson J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 2589–2594.

Owsianka A., Clayton R.F., Loomis-Price L.D., McKeating J.A., Patel A.H. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2 // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 1877–1883.

Patel A.H., Wood J., Penin F., Dubuisson J., McKeating J.A. Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding// *J. Gen. Virol.* 2000. V. 81. P. 2873–2883.

Petracca R., Falugi F., Galli G., Norais N., Rosa D., Campagnoli S., Burgio V., Di Stasio E., Giardina B., Houghton M., Abrignani S., Grandi G. Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding // *J. Virol.* 2000. V.74. № 10. P. 4824–4830.

Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Grandi G., Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81 // *Science.* 1998. V. 282. P. 938–941.

Riddles P. W., Blakeley R. L., Zerner B. Reassessment of Ellman's reagent// *Methods Enzymol.* 1983. V. 91. P.49–60.

Rosa D., Campagnoli S., Moretto C., Guenzi E., Cousens L., Chin M., Dong C., Weiner A.J., Lau J.Y.N., Choo Q.L., Chien D., Pileri P., Houghton M., Abrignani S.C. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells // *PNAS USA.* 1996. V. 93. P. 1759–1763.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *PNAS USA.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.

Yagnik A. T., Lahm, A., Meola A., Roccasecca R. M., Ercole B. B., Nicosia A., Tramontano A. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 // *Proteins.* 2000. V. 40. № 3. P. 355–366.

Yanagi M., St.Claire M., Shapiro M., Emerson S. U., Purcell R. H., Bukh J. Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infective in vivo // *Virology.* 1998. V. 244. P. 161–172.

Yurkova, M. S., Patel, A. H., Fedorov, A. N. Expression, purification, and characterization of functional non-glycosylated structural protein E2 of hepatitis C virus // *Prot. Exp. Purif.* 2004. V. 37. P.119–125.

Zhang J., Randall G., Higginbottom A., Monk P., Rice C.M., McKeating J.A. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection // *J.virol.* 2004. V. 78. № 3. P. 1448–1455.

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М.С. Юркова

*АО ВНЦ Молекулярная диагностика и лечение
117638 г. Москва, Симферопольский пр.8
E-mail: maria_yurkova@hotmail.com*

В работе представлен конспективный обзор наиболее используемых в медицинской практике методов молекулярной диагностики, таких как ПЦР, ОТ-ПЦР и ИФА. Диагностика с помощью перечисленных методов эффективна в том случае, если патологическое состояние характеризуется присутствием каких-либо маркерных молекул, отсутствующих в норме. Ключевые слова: ПЦР-диагностика, ОТ-ПЦР, иммуноферментный анализ

Work presents the concise survey of the most utilized in the medical practice methods of molecular diagnostics, such as PCR, RT-PCR and ELISA. Diagnostics performed with the help of the enumerated methods is effective when pathologic state is characterized by the presence of any marker molecules, which are absent in normal conditions.

Keywords: molecular diagnostics of the diseases, PCR, RT-PCR, ELISA

Метод ПЦР заключается в многократном увеличении количества (амплификации) определенного фрагмента ДНК. Реакция осуществляется под действием термостабильного фермента Таq-ДНК-полимеразы; в реакционную смесь добавляют фермент, ДНК – матрицу, праймеры и дезоксирибонуклеотиды. В результате реакции амплифицируется фрагмент ДНК, ограниченный праймерами; его можно увидеть в ультрафиолетовом свете в виде полосы на электрофореze в агарозном геле после окрашивания бромистым этидием.

ПЦР-диагностика применяется в случае, если возбудитель заболевания имеет генетическую информацию в форме ДНК (хламидии, гепатит В, туберкулез, цитомегаловирус, токсоплазмоз и т.д.). В данном случае задача состоит в том, чтобы реакция ПЦР была стабильно воспроизводимой. Поэтому, как правило, амплифицируют не очень большой фрагмент (например, около 400 нп), что обеспечивает стабильность работы полимеразы и сокращает время анализа. Праймеры подбирают специфические к консервативным участкам ДНК возбудителя. Это особенно важно в случае, если возбудитель имеет несколько форм (подтипов, вариантов).

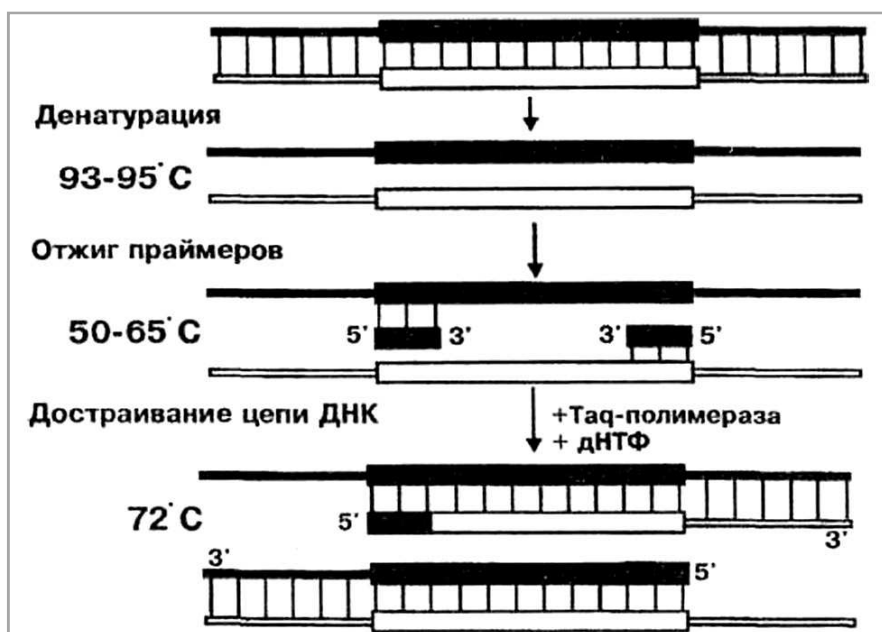


Рис. 1. Первый цикл амплификации

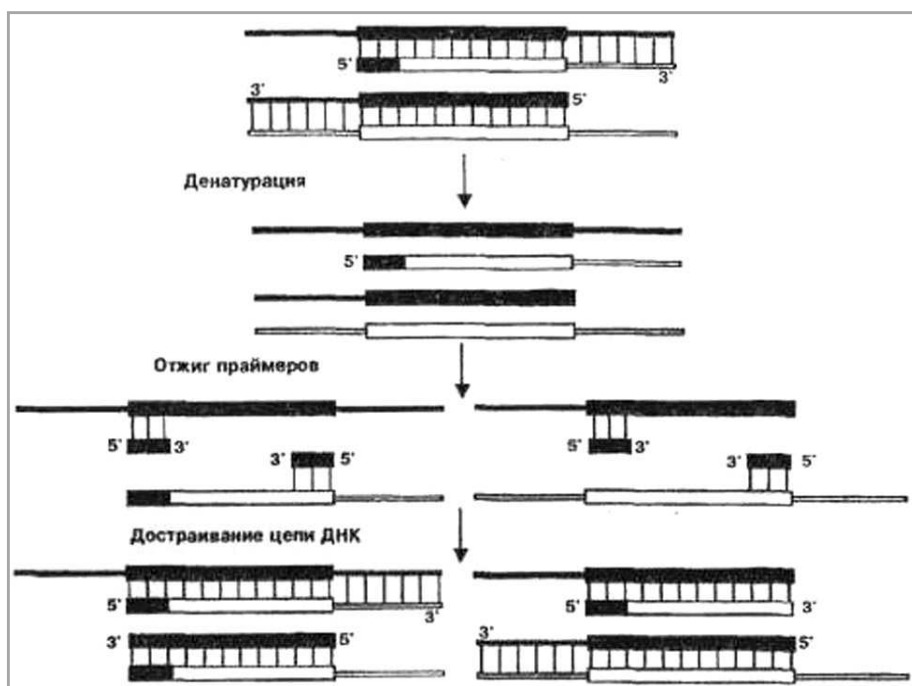


Рис. 2. Второй цикл амплификации

ОТ-ПЦР применяется для выявления вирусов, генетическая информация которых представлена в виде РНК; это ВИЧ и ВГС (вирус гепатита С). Метод отличается от описанного выше добавлением еще одной предварительной стадии – реакции обратной транскрипции, которую осуществляет фермент обратная транскриптаза, также известная как ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.49), катализирующая синтез кДНК (комплементарной ДНК) на матрице РНК. В реакционную смесь добавляют фермент, ингибиторы РНКазы, РНК – матрицу, один (обратный) праймер и дезоксирибонуклеотиды. В результате реакции обратной транскрипции получается кДНК, которая затем используется в качестве матрицы для реакции ПЦР, описанной выше.

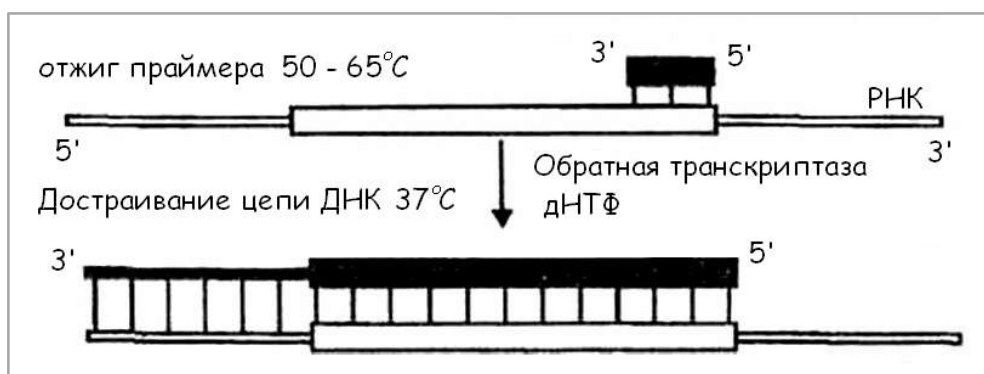


Рис. 3. Реакция обратной транскрипции.

Как и в предыдущем случае, результатом анализа является наличие/отсутствие полосы ожидаемого размера в электрофорезе в агарозном геле. Как правило, в наборах для диагностики установлен порог, при преодолении которого результат анализа считается положительным, а также прилагаются положительные и отрицательные контроли. Проблема ложно-положительных или ложно-отрицательных результатов особенно заметна именно в случае ОТ-ПЦР, поскольку РНК гораздо лабильнее, чем ДНК, а в случае ВГС, например, в хронической стадии заболевания количество вирусных частиц настолько мало, что среди результатов анализа довольно велико количество ошибок.

Иммуноферментный анализ (ИФА) в разной постановке применяют как для определения наличия антител, так и других белковых молекул. Он не требует больших материальных затрат, при относительной простоте обладает высокой чувствительностью, что дает возможность проводить исследование при наличии минимального количества подопытного материала. Для определения наличия антител применяют прямой ИФА:

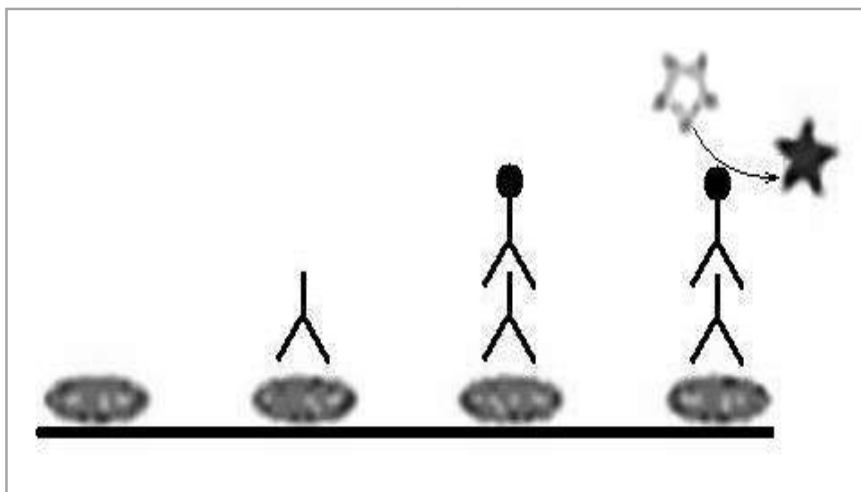


Рис. 4. Схема прямого ИФА.

На подложке в 96-луночной планшете сорбируют интересующий антиген (в наборах для диагностики это сделано заранее), затем в лунки добавляют исследуемую сыворотку.

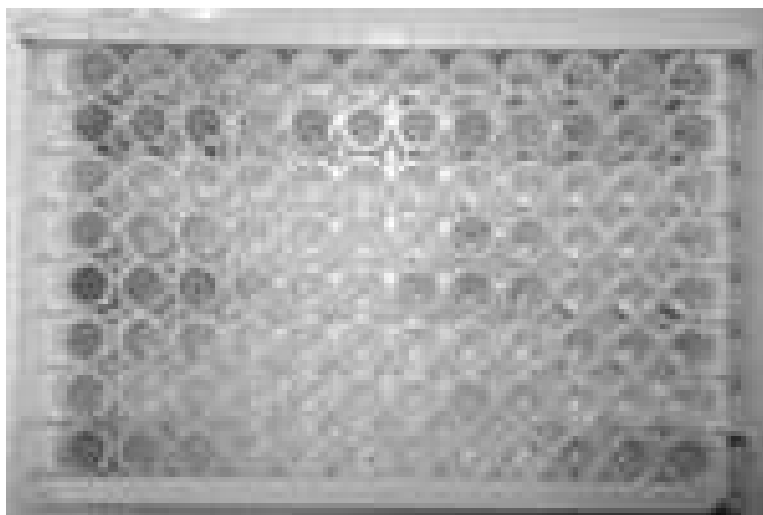


Рис. 5. 96-луночный планшет с окрашенными лунками.

Если в сыворотке присутствуют антитела на сорбированный антиген, они свяжутся с ним. Несвязавшийся материал отмывают, после чего инкубируют с конъюгатом. В диагностических наборах это, как правило, антитела животного (козы, например) к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Пероксидаза хрена – фермент, к которому подобрано довольно много субстратов, способных

изменять окраску в результате реакции. Наиболее часто используются орто-фенилендиамин (продукт желто-коричневый, растворимый, поглощает при 492 нм); 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (продукт голубой, растворимый, поглощает при 450 нм). В лабораторной практике применяется большее разнообразие субстратов, в том числе хемотропный, что значительно повышает чувствительность метода. Реакцию останавливают добавлением 0.5М серной кислоты, оптическое поглощение измеряют в специальном приборе ELISA reader.

Метод непрямого ИФА применяют для определения присутствия других компонентов, помимо антител (пептидов, гормонов). Чтобы определить пептид с помощью метода непрямого ИФА, нужно иметь два моноклональных антитела к двум неперекрывающимся эпитопам этого пептида. Одно из этих антител конъюгируют с пероксидазой хрена.

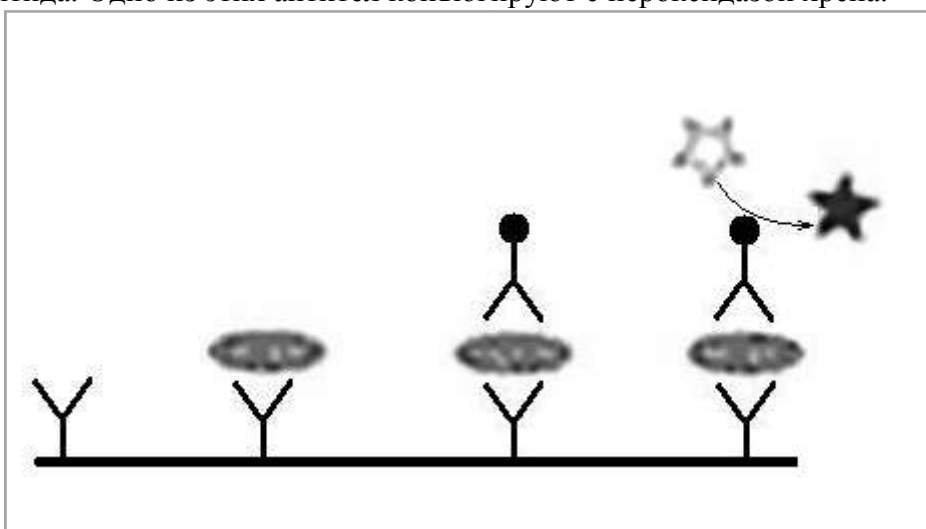


Рис. 6. Схема непрямого ИФА.

На подложке сорбируют первые антитела. Затем в лунках инкубируют исследуемую биологическую жидкость, а затем (или одновременно) – вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой. Результатом теста является, как и в случае прямого ИФА, окрашивание субстрата пероксидазы в лунках. С помощью метода ИФА стало возможным диагностировать широкий спектр различных инфекций. Например, вирусные инфекции (цитомегаловирус, ВИЧ, герпес, гепатиты), большинство инфекций, передаваемых половым путем (микоплазмоз, сифилис, хламидиоз, уреаплазмоз), а также боррелиоз, энцефалит клещевой и прочие. В заключение приводим в качестве примера таблицу диагностической лаборатории. Вещества, выявляемые методом иммуноферментного анализа, представлены в правом столбце таблицы.

Таблица. Вещества, выявляемые с помощью ИФА.

Область диагностики	Маркеры состояния (заболеваний)
Гормоны и маркеры заболеваний щитовидной железы	Тиреопероксидаза (ТПО), Тиреоглобулин (ТГ), Тиреотропный гормон (ТТГ), Тироксин (Т4) Трийодтиронин (Т3), Свободный тироксин (Т4) Свободный трийодтиронин (Т3)
Диагностика репродуктивной функции	Лютеинизирующий гормон (ЛГ), Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), Хорионический гонадотропин (ХГ), Пролактин, Прогестерон, Эстрадиол, Тестостерон, Кортизол, Стероид связывающий глобулин (ССГ), Альфафетопротеин (АФП)
Онкомаркеры	Хорионический гонадотропин (ХГ), Простат-специфический антиген (ПСА), СА – 125, СА – 19.9, CYFRA – 21-1, М – 12 (СА – 15.3), MUC – 1 (М – 22), MUC1 (М – 20), Альвеомуцин, К – цепь, L – цепь, Фактор некроза опухолей (ФНО α), γ – интерферон, Раково-эмбриональный антиген (РЭА)
Диагностика инфекционных заболеваний	Токсоплазма (IgG, IgM), Краснуха (IgG, IgM), Цитомегаловирус (IgG, IgM), Герпес (IgG, IgM), Туберкулез (IgG, IgM), Корь (IgG, IgM), Гепатит Д, Е, А (ВГД, ВГЕ, ВГА), Гепатит С (ат ВГС, ВГСscore), Гепатит В (HBs, HBe HBscore), Уреаплазма (IgG, IgM), Микоплазма (IgG, IgM), Хламидия (IgG, IgM), Микоплазма (IgG), Сифилис (IgG), Аспергиллез (IgG), Лямблии (IgG), Helicobacter Pylori (IgG), Псевдотуберкулез (IgG, IgM), Кандида (IgG), Герпес (IgG, IgM), Эпштейн-Барр (IgG, IgM), Цитомегаловирус (IgG, IgM)
Диагностика аутоиммунных заболеваний и определение иммунного статуса	IgE – общий, С-реактивный белок (СРБ), Глиадин (IgG, IgA), IgG4, Общий IgG, IgG2, Общий IgA, Секреторный IgA, Общий IgD, Общий IgM, Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК)
Маркеры заболеваний сердца	Тропонин I, Натрий-диуретический пептид мозга

**МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

С.Ю. Кузьмина

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 Ярославская обл., Некоузский р-он, пос. Борок.
E-mail: Lisichka_light@mail.ru*

Общий обзор традиционных методов и методов молекулярных технологий в диагностике злокачественных новообразований. Обзор основных онкомаркеров. В статье рассмотрена практическая ценность применения методов молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: диагностические, прогностические, предективные тесты, онкомаркеры, ПЦР-диагностика

Overall review of traditional methods and molecular technology methods in malignant neoplasms diagnostic. Oncological markers review. The article describes application of molecular-genetic researches practical value.

Key words: diagnostic, prognostic, predictive tests, oncological markers, PCR-diagnostics

Онкологические болезни являются одними из самых древних групп заболеваний. Термин «рак» ввел в обращение «отец медицины» Гиппократ. Рак, как болезнь, поражающая человека, известен с незапамятных времен. Палеонтологи обнаружили опухолевые изменения в челюсти первобытного человека, жившего около полумиллиона лет назад. Рак упоминается в старинных папирусах. Для злокачественных новообразований, в частности опухолей, характерны два основных признака: 1) бесконтрольная (не регулируемая внешними сигналами) пролиферация клеток и 2) их способность проникать в окружающие ткани и отдаленные органы (инвазивный рост и метастазирование). Если первый признак свойственен не только злокачественным, но и доброкачественным опухолям, то второй отличает злокачественные опухоли. Злокачественные опухоли эпителиальных тканей носят название рак, или карцинома, а неэпителиальных (мезенхимных) тканей – саркома. До 90 % всех злокачественных опухолей составляет рак. Поэтому все злокачественные образования принято называть раковыми.

Злокачественное новообразование развивается в результате генетических нарушений единственной клетки. Единичного генетического повреждения, как правило, недостаточно для превращения клетки в опухолевую (трансформированную). Лишь накопление 5 – 10

мутаций в течение продолжительного времени (часто многих лет), приводит к появлению злокачественного новообразования.

Факторы внешней и внутренней среды, которые могут быть причинами возникновения опухолей и способствовать их развитию, называются канцерогенными. По данным Комитета по профилактике рака ВОЗ, 90% опухолей связано с воздействием внешних факторов, а 10% зависят от генетических факторов и вирусов. Но такое мнение весьма спорно.

Устойчивость клетки к опухолевой трансформации обеспечивают защитные механизмы иммунной системы организма. Но однажды иммунная система дает сбой, по каким-то недостаточно изученным причинам пропуская "бракованную" клетку, способную к непрерывному размножению и неконтролируемому росту. Раковая клетка начинает жить по своей собственной программе, безудержно размножаясь и игнорируя сигналы из окружения. Она образует множество себе подобных клеток, которые приобретают способность отрываться от своего первоначального места, мигрировать в другие части тела и размножаться там, образуя метастазы. Чем дальше, тем агрессивнее становятся эти клетки, и в конце концов, когда они поражают жизненно важные системы, организм погибает. По всей вероятности, именно нарушения иммунной системы являются определяющими в развитии опухолей, поскольку возникновение клеточного «брака» неизбежно, и все зависит от того, насколько безотказно и эффективно он распознается и своевременно уничтожается. Неблагоприятные условия, в которые попадают клетки внутренних органов, нарушают их функцию. Больше всего это заметно на гормонально зависимых органах и железах внутренней секреции. Это обуславливает повышенный риск возникновения рака молочной железы, матки и яичников у женщин, предстательной железы у мужчин и т.д. Часто именно эта причина становится главной в развитии опухолей у людей молодого возраста.

Рак является одной из основных причин смерти в мире. По данным ВОЗ каждый год от онкологических заболеваний в мире умирают более 7.5 млн. человек. Ежегодно большинство случаев смерти от рака происходит от рака легких, желудка, печени, толстого кишечника и молочной железы. По прогнозам, число случаев заболевания от рака будет продолжать расти от 14 миллионов в 2012 году до 22 миллионов в следующие десятилетия. Главная задача профилактики злокачественных новообразований сводится к активному выявлению и лечению больных предопухолевыми заболеваниями и выявлению и лечению больных на ранней стадии заболевания. Большинство онкологических заболеваний поддаются лечению при их своевременном выявлении.

К традиционным методам диагностики онкологических заболеваний относят рентгенологические методы, рентгенографическое обследование,

маммографию, компьютерную и ультразвуковую томографию, эндоскопию, биопсию, цитологические и цитогистологические методы. Для диагностики используют и современные достижения науки в области лучевой, магнитной и ядерной физики – радиоизотопную диагностику, радионуклидный метод, магнитно-резонансную томографию, ЯМР-спектроскопию *in vivo*, позитронную эмиссионную томографию, термографию.

В последние годы в связи с развитием биохимии и молекулярной биологии открываются значительные перспективы в своевременной диагностике и лечении онкологических заболеваний. Понимание механизмов канцерогенеза, открытие биомаркеров и расшифровка генома человека позволили создать диагностические, прогностические и предиктивные тесты в сфере онкологии.

Молекулярные технологии в диагностике злокачественных новообразований

Достижения молекулярной онкологии позволяют рассматривать онкологическое заболевание как болезнь, которая характеризуется клональной эволюцией трансформированных клеток в том или ином органе или ткани. Известно, что раковые клетки возникают вследствие накопления мутаций в критических протоонкогенах и ассоциированных с опухолями генах-супрессорах. На основании этого логично предположить, что раннее выявление опухолевого зачатка возможно, хотя и сложно методически. Обнаружить опухоль на ранних стадиях ее развития можно при исследовании биологических жидкостей, в которых могут быть обнаружены те или иные биомолекулы, являющиеся продуктами жизнедеятельности развивающейся опухоли или результатом реакции различных систем организма на появившиеся опухолевые клетки.

Есть и другой аспект проблемы, который связан с ранним распознаванием метастазов. Наличие минимальной остаточной опухоли и микрометастазов существенно ограничивает перспективу дальнейшего увеличения показателей выживаемости. До последнего времени поиск микрометастазов осуществляли только традиционными методами световой микроскопии, которые в большинстве случаев оказываются неэффективными. Развитие иммуноцитохимических и молекулярно-биологических технологий сделало возможной идентификацию единичных изолированных опухолевых клеток в лимфатических узлах, серозных жидкостях организма, периферической крови и костном мозге. В частности, удастся выявить одну опухолевую клетку среди 1000000 разнообразных по своей природе кроветворных клеток костного мозга. Современная диагностика опухолей предусматривает обязательное применение наряду с классическими морфологическими методами иммуноцитохимических и молекулярно-генетических методов.

Маркеры опухолевого роста и их выявление

Существует три группы маркеров опухолевого роста, которые ассоциированы с белками, РНК и ДНК. Белок-ассоциированные маркеры могут определяться в обычных пробах крови рутинными биохимическими и иммунохимическими методами. Среди таких маркеров следует упомянуть простатоспецифический антиген ПСА при раке предстательной железы, СА 125 при раке яичника, раково-эмбриональный антиген РЭА при карциномах органов пищеварительного тракта, человеческий хорионический гонадотропин при трофобластических опухолях, альфа-фетопротеин при гепатоцеллюлярном раке и эмбриональных карциномах. Выявление этих белков важно для определения прогноза и мониторинга заболевания, раннего обнаружения метастазов и рецидивов опухоли. Однако их применение ограничено, так как они недостаточно специфичны для какой-либо одной опухоли или типа опухолей, а их присутствие в крови часто указывает на уже распространенный процесс.

Использование маркеров, ассоциированных с РНК, основано на наличии мутаций в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей, которые могут определяться и в транскриптах. РНК – менее подходящий субстрат для клинической диагностики опухолей, чем ДНК, так как она легко деградирует, но оценка экспрессии на уровне РНК все же осуществима. Современные методы позволяют определять экспрессию тех или иных мутантных генов, в частности путем выделения их РНК-продуктов из клинического материала с последующей обратной транскрипцией (ОТ) и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для амплификации ДНК (ОТ-ПЦР). Этот метод дает возможность определять экспрессию генов в клетках крови, лимфатических узлов и костного мозга. Анализ цельной крови и костного мозга на наличие аномальных транскриптов, полученных из трансформированных клеток, применяют для мониторинга больных с хроническим миелолейкозом, минимальной резидуальной болезнью. Наиболее перспективно использование этого метода для обнаружения микрометастазов – единичных опухолевых клеток в тканях.

ДНК – идеальный субстрат для молекулярной диагностики, так как она весьма стабильна и может быть быстро амплифицирована с помощью техники ПЦР, что дает возможность обойтись минимальным количеством клеточного материала. Удалось обнаружить мутации гена p53 в ДНК, определяемой в моче больных раком мочевого пузыря, а также мутации онкогена Ras в ДНК, обнаруженной в выделениях при колоректальном раке. Мутации обоих генов выявлены в ДНК, содержащейся в мокроте больных раком легкого.

Чтобы анализировать ДНК опухолевого происхождения в плазме крови при массовых обследованиях, необходима была высокая

чувствительность метода. Это стало возможным после разработки метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволяет тестировать десятки или даже единичные последовательности ДНК.

При любой локализации рака в кровь пациента попадают: а) сами раковые клетки – из стенок мозаичных капилляров узелка из раковых клеток в 1-2 мм в диаметре и б) гены-маркеры из погибших раковых клеток еще задолго до проявления как первичного очага рака, так и его метастазов. Это и позволяет выявлять рак у пациента с самого начала, т.е. с размера узелка в 1-2 мм в диаметре.

Для выполнения ПЦР-анализа пригодны любая ткань, биологическая жидкость и выделения человека. ПЦР позволяет в биологических жидкостях от больного выявлять самые начальные изменения в структуре ДНК клеток, а в сущности предрак; с помощью ПЦР удастся обнаружить даже одну дефектную или мутантную молекулу ДНК из раковых клеток среди многих других молекул в исследуемой жидкости; чувствительность этого метода до 100%. Таким образом, ПЦР – это универсальный метод для ранней диагностики раковых клеток любой локализации рака у пациента.

Отличительной особенностью методов ПЦР и метода обратной транскрипции является использование малого количества (250 мкл) объема капиллярной крови в качестве образца. В литературе имеются сведения, что опухоль и её метастазы способны выбрасывать в циркуляцию не только единичные клетки, но и продукты их деградации, иммунные комплексы, а также нуклеиновые кислоты, в том числе и специфические РНК. Эти РНК связываются с белками плазмы и поверхности форменных элементов крови, что предохраняет их от деградации. Следовательно, их можно детектировать в лизатах небольших образцов крови. Таким образом, методы ПЦР и ОТ оказываются малоинвазивными и достаточно информативными для скрининга и первичной диагностики. Методы также применимы в клинике для послеоперационного мониторинга выброса фрагментов опухоли в кровоток, оценки угрозы метастазирования и в качестве вспомогательных методов дифференциальной диагностики.

Важное место в обнаружении опухолевых клеток занимает анализ последовательностей нуклеотидов микросателлитных повторов ДНК, который позволяет установить как наличие нового аллеля гена (что свидетельствует о нестабильности микросателлитной ДНК), так и потерю одного из его аллелей (потерю гетерозиготности). Такие находки указывают на присутствие клеточных клонов, содержащих измененную генетическую информацию, что характерно для опухолевых клеток. "Микросателлитный анализ" применяли при исследовании мочи у больных раком мочевого пузыря и гипернефромой, слюны при опухолях головы и шеи, панкреатического сока при раке поджелудочной железы, изучении пункционных аспиратов при раке молочной железы, мокроты при раке легкого.

Несмотря на возможности, связанные с использованием перечисленных маркеров опухолевого роста, пока еще не существует абсолютно надежных методов ранней (досимптомной) диагностики опухолей. В преобладающем большинстве случаев врачам-онкологам приходится иметь дело с уже развившимися опухолями. И основными задачами являются морфологическое подтверждение диагноза, установление гистоструктуры и гистогенеза опухоли, определение степени ее злокачественности, выявление метастатического поражения регионарных и отдаленных лимфатических узлов, других органов, дифференциальная диагностика с иными патологическими процессами. Решая эти вопросы, используют материал, полученный при биопсии опухолей и лимфатических узлов, клетки крови, пунктаты костного мозга, экссудаты из серозных полостей, а также смывы и соскобы, сделанные во время оперативного вмешательства.

Таким образом, широко используемые в настоящее время тесты на опухолевые маркеры представляют собой информативные, простые в исполнении, доступные по цене, нетравматичные методы наблюдения за онкологическими больными, позволяющие осуществлять оценку эффективности лечения и доклиническое выявление развития рецидива заболевания. Кроме того, исследовать опухолевые маркеры весьма полезно у лиц с повышенным онкологическим риском (наличие родственников, больных раком; работники вредных производств и др.) для раннего выявления онкологических заболеваний. Современной медицине хорошо известно, что для успешного лечения раковых заболеваний самое главное – это ранняя диагностика, которой способствует анализ на онкомаркеры. В комплексе с другими методами исследования онкомаркеры дают врачу более полную информацию о наличии раковых клеток в организме. Чтобы назначить эффективную терапию, необходимо провести целую серию подобных анализов в развернутой форме. И даже если они становятся показателями наличия доброкачественных образований, дополнительные исследования необходимы, чтобы выявить нарушения функций отдельных органов.

Список литературы

- Глоба А.Г., Демидова В.С., Дикова О.Н., Вишневский В.А., Щёголев А.И. Исследования уровней РНК-онкомаркеров в крови пациентов со злокачественными образованиями желудочно-кишечного тракта // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56. № 4. С. 510–516.
- Рукавишников А.И. Азбука рака. Волгоград: ВГМУ, 2007. 360 с.
- Сергеева Н.С., Маришутина Н.В. Опухолевые маркеры в диагностике и лечении рака // Вместе против рака. 2014.

Виды опухолевых маркеров (онкомаркеры)

Онкомаркер	Типы рака	Материал для анализа	Область использования
ALK генной перестройки	Немелкоклеточный рак легкого и анапластическая крупноклеточная лимфома	Клетки опухоли	Для определения метода лечения и прогноза
Альфа - фетопrotein (AFP)	Рак печени и опухоли половых клеток	Кровь	Для диагностики рака печени и последующей реакции на лечение, оценки стадии, прогноза и ответ на лечение рака/опухолей половых клеток
Бета-2 микроглобулин (B2M)	Множественная миелома, хронический лимфолейкоз, некоторые лимфомы	Кровь, моча, или спинномозговая жидкость	Для определения прогноза и последующей реакции на лечение
Бета - хорионический гонадотропин человека (бета-ХГЧ)	Хориокарцинома и рак яичек	Моча или кровь	Для оценки стадии, прогноза и ответа на лечение
BCR - ABL гибридный ген	Хронический миелолейкоз	Кровь и / или костный мозг	Для подтверждения диагноза и мониторинга состояния болезни
BRAF мутации V600E	Меланома и рак толстой кишки	Опухоль	Чтобы предсказать ответ на целевую терапию
CA15-3/CA27.29	Рак молочной железы	Кровь	Для оценки эффективности лечения и выявления возможного рецидива

CA19-9 Канцерный антиген 19-9	Рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, желчных протоков и рака желудка	Кровь	Для оценки эффективности лечения
CA-125 Углеводный антиген 125	Рак яичников	Кровь	Для помощи в диагностике, оценки эффективности лечения и возможного рецидива
Кальцитонин	Медуллярный рак щитовидной железы	Кровь	Для помощи в диагностике, оценки эффективности лечения и оценки возможного рецидива
Раково - эмбриональный антиген (РЭА)	Колоректальный рак и рак молочной железы	Кровь	Для оценки возможного распространения колоректального рака, мониторинга рецидива рака молочной железы и оценке ответа на лечение
CD20 Фосфопротеин	Неходжкинская лимфома	Кровь	Для определения целесообразности назначения целевой (таргетинговой) терапии
Хромогранин (CGA)	Нейроэндокринные опухоли	Кровь	Для помощи в диагностике, оценки эффективности лечения и оценки возможного рецидива
Хромосомы 3, 7, 17 и 9p21	Рак мочевого пузыря	Уретра	Контроль за рецидивом рака
Фрагмент Цитокератина 21-1 (CYFRA 21-1)	Рак легких	Кровь	Контроль за рецидивом рака

Анализ на EGFR мутацию	Немелкоклеточный рак легкого	Опухоль	Для определения метода лечения и прогноза
Рецепторы эстрогена (ER) / рецепторы прогестерона (PR)	Рак молочной железы	Опухоль	Для определения возможности гормональной терапии рака груди
Фибрин / фибриноген	Рак мочевого пузыря	Уретра	Для мониторинга эффективности лечения и развития рецидива
HE4 (Human epididymis protein 4)	Рак яичников	Кровь	Для оценки эффективности лечения и мониторинга рецидива
HER2/neu (Neu, ErbB-2, CD340) — мембранный белок	Рак молочной железы, рак желудка и рак пищевода	Опухоль	Для определения возможности гормональной терапии рака
Иммуноглобулины	Множественная миелома и макроглобулинемия Вальденстрема	Кровь и уретра	Для диагностики заболевания, оценки ответа на лечение и выявления рецидива
KIT ген, кодирующий белок c-kit	Желудочно-кишечные стромальные опухоли слизистой оболочки и меланомы	Опухоль	Помощь в диагностике и определение стратегии лечения
Анализ мутации KRAS (Протоонкоген)	Колоректальный рак и немелкоклеточный рак легкого	Опухоль	Для определения возможности применения таргетинговой (целевой) терапии

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Опухоли половых клеток	Кровь	Для диагностики, оценки ответа на лечение и прогноза
Ядерный матриксный белок 22 (Nuclear matrix protein 22)	Рак мочевого пузыря	Уретра	Для мониторинга реакции на лечение
Простат - специфический антиген (ПСА)	Опухоли / рак предстательной железы	Кровь	Для диагностики заболевания, оценки ответа на лечение и выявления рецидива
Тиреоглобулин	Рак щитовидной железы	Опухоль	Для оценки ответа на лечение и выявления рецидива
(УАП, урокиназа) Урокиназный активатора плазминогена (uPA) ингибитор активатора плазминогена (PAI-1)	Рак молочной железы	Опухоль	Для определения агрессивности рака груди и планирования лечения
5-Protein signature (Ova1) молекулярный тест (биомаркер рака яичников)	Рак яичников	Кровь	Для диагностики рака яичников и правильного планирования лечения / операции
Oncotype DX генетический тест	Рак молочной железы	Опухоль	Для оценки риска рецидива
Mammaprint - генетический тест	Рак молочной железы	Опухоль	Для оценки риска рецидива

**ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ ФОРМУЛА КРОВИ
У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ПЕРЕВИТЫМ РАКОМ ПОЧКИ
ПРИ РАЗНЫХ МЕТОДАХ ВВЕДЕНИЯ
ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ**

**Д.А. Мудрак, Н.А. Наволокин, С.А. Тычина, Н.В. Корчаков,
Н.В. Полуконова, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская**

*ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения РФ,
410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 112.
E-mail: navolokin1@rambler.ru, polukonovanv@yandex.ru*

В работе проведено исследование изменения лейкоцитарной формулы крови у лабораторных крыс с перевиваемым раком почки РА при внутримышечном и пероральном введении экстрактов аврана лекарственного, кукурузы антоциановой и бессмертника песчаного. Было установлено, что внутримышечное и пероральное введение экстракта аврана не сопровождается изменением лейкоцитарной формулы крови животных с опухолью. Введение экстрактов бессмертника и кукурузы сопровождается увеличением количества сегментоядерных лейкоцитов у животных с перевитой опухолью.

Ключевые слова: кровь, белые лабораторные крысы, флавоноиды, *Zeamays*, *Helichrysum arenarium*, *Gratiolaofficinalis*

In this paper, we study changes in blood leukocyte counts conducted in laboratory rats with transplanted kidney cancer PA intramuscular and oral administration of extracts of *Gratiola officinalis*, *Zea mays*, *Helichrysum arenarium*. We found that intramuscular and oral administration of the extract *Gratiola officinalis* accompanied by changes in blood leukocyte counts of tumor bearing animals. Number of segmented leukocytes increases with the introduction of *Zea mays* L. and *Helichrysum arenarium* extracts from tumor-bearing animals.

Keywords: blood, white lab rat, flavonoids, *Zea mays*, *Helichrysum arenarium*, *Gratiola officinalis*.

Введение

Увеличение распространенности и смертности от онкологических заболеваний определяет поиск новых биологически активных веществ с противоопухолевой активностью, в том числе и растительного происхождения. Наиболее перспективную группу в этом отношении представляют собой растительные флавоноиды. В то же время поиск

новых противоопухолевых средств направлен в сторону малотоксичных и нетоксичных веществ. Одним из проявлений токсичности препарата является его влияние на клетки крови.

Для исследования нами выбраны три растения – 1) авран лекарственный, содержащий, по крайней мере, четыре флавоноида – апигенин, космосиин, аврозид и кверцетин; 2) антоциановая форма кукурузы обыкновенной, изначально созданная генетиками как источник стойкого антоцианового красителя, в которой обнаружены три антоциана - цианидин, хризантемин (3-О-β-D-гликопиранозоид цианидина), идеин (3-О-β-D-галактопиранозоид цианидина) и пять флавоноидов: трицин (5,7,4'-тригидрокси-3',5'-диметоксифлавоон), кампферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавонол), кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол), астрагалин (3-О-β-D-глюкопиранозоид кемпферола), изокверцетин (3-О-β-D-глюкопиранозоид кверцетина); 3) бессмертник песчаный, цветки которого содержат флавоноиды (6,5%: гелихризин, лютеолин, апигенин, нарингенин, кверцетин и его гликозиды, кемпферол, салипурпозид, изосалипурпозид).

Разработан авторский способ спиртовой экстракции флавоноидов из этих растений с очисткой хлороформом от ядовитых и балластных веществ. Данная работа направлена на выявление влияния исследуемых экстрактов на кровь белых лабораторных крыс с перевиваемым раком почки РА.

Цель: исследовать изменения лейкоцитарной формулы крови у лабораторных крыс с перевиваемым раком почки РА при внутримышечном и пероральном введении экстракта аврана лекарственного, кукурузы антоциановой и бессмертника песчаного.

Материал и методика

В работе использованы экстракты аврана лекарственного (*Gratiola officinalis*), кукурузы обыкновенной антоциановой (*Zea mays*) и бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*), полученные авторским способом, 42 белые лабораторные крысы-самцы с перевитым раком почки (РА), морфологические методы.

Дизайн: эксперимент проводился в соответствии с руководствами по доклиническим исследованиям лекарственных средств (Хабриев, 2005). Все животные были разделены на семь групп (табл. 1), по шесть в каждой группе: 1 – контрольная группа сравнения; 2 – внутримышечное введение аврана, 3 – пероральное введение аврана, 4 – внутримышечное введение бессмертника, 5 – пероральное введение бессмертника, 6 – внутримышечное введение кукурузы, 7 – пероральное введение кукурузы.

В контрольной группе сравнения воздействие не оказывалось, а в экспериментальных группах экстракты вводились внутримышечно и перорально ежедневно в течение 14 дней, начиная со второго дня после

перевивки опухоли в следующих дозировках: для аврана лекарственного – 110 мг/кг; для кукурузы антоциановой – 320 мг/кг; для бессмертника песчаного – 500 мг/кг. В последний день эксперимента все животные выводились из эксперимента путем декапитации, забирался материал для исследования, в том числе были выполнены мазки крови.

Результаты исследования и их обсуждение

Отметили отсутствие изменений в лейкоцитарной формуле крови в группах животных, получавших экстракт аврана лекарственного как перорально, так и внутримышечно по сравнению с группой сравнения.

Выявили ($p < 0.005$) увеличение количества сегментоядерных лейкоцитов в два раза при внутримышечном и пероральном введении бессмертника и внутримышечном и пероральном введении кукурузы антоциановой по сравнению с группой сравнения.

Выводы

Внутримышечное и пероральное введение экстракта аврана не сопровождается изменением лейкоцитарной формулы крови животных с опухолью. Введение экстрактов бессмертника и кукурузы сопровождается увеличением количества сегментоядерных лейкоцитов у животных с перевитой опухолью.

Список литературы

Корман Д. Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. 512 с.

Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов). Самара: СамГМУ, 2004. 1239 с.

Купчак Т.В., Николаева Л.О., Шимолина Л.Л. Выделение и идентификация антоцианов из гибридной кукурузы // Фармацевтич. журнал. 1995. № 6. С. 62–64.

Купчак Т.В. Фитохимическая характеристика гибридной формы кукурузы *Zea mays* L. и технология антоцианового красящего препарата. Автореф. дисс. ... к. фарм. н. СПб. 1998. 23 с.

Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Наволокин Н.А., Широков А.А., Буров А.М. Применение морфологических методов исследования в наноонкологии // Вестник биотерапевтического журнала. 2011. № 4. С. 104.

Наволокин Н.А., Павлова А.В. Морфологические изменения в мышцах у лабораторных крыс и определение токсичности при введении экстракта аврана // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2012. Т. 2. Вып. 2. С. 82.

Наволокин Н.А., Андреева А., Рыкалина Е.Б., Байтман Т.П., Полуконова Н.В. К вопросу о механизмах противоопухолевого действия растительных экстрактов // Тез. II Междун. науч.-практ. конф. «Современная медицина и фармацевтика: анализ и перспективы развития», Москва. 2012. С. 21–23.

Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. V. 1. № 2. 0203.

Полуконова Н.В., Федорова И.А., Гошненко А.В., Тырнов В.С. Токсикологическая, канцерогенная и мутагенная безопасность антоциановой формы кукурузы *Zea mays* L. как источника красного красителя // Бюллетень ботанического сада СГУ. Вып. 9. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2010. С. 158–162.

Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Райкова С.В. и др. Анализ химического состава и биологических свойств спиртового экстракта растительного сырья гибридной формы кукурузы *Zea mays* L. // Мат. IV Всерос. конф. «Фармобразование 2010», Воронеж, 2010. С. 306–311.

Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Дурнова Н.А. Патент Российская Федерация. 2482863. Способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiolaofficinalis*L.). 2013.

Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiolaofficinalis*L.) // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165–173.

Boryczka S., Bebenek E., Jastrzebska M., Kusz J., Zubko M. Crystal structure of betulinic acid-DMSO solvate // Zeitschrift für Kristallographie. CrystallineMaterials. 2012. V. 227. № 6. P. 379–384. doi: 10.1524/zkri.2012.1527.

Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 2005. 832 с.

Таблица 1. Средние значения показаний лейкоцитарной формулы крови у лабораторных крыс с перевитым раком почки.

Группа	Палочки	Сегменты	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лейкоциты
Контрольная группа	9.75±1.49	8.75±0.25	1.00±0.25	0.75±0.25	8.25±0.95	71.5±2.72
Внутримышечное введение аврана	7.75±1.03	10.00±1.08	0.75±0.25	0.50±0.29	9.25±1.31	71.75±0.95
Пероральное введение аврана	9.75±0.48	10.00±1.1	0.50±0.29	0.50±0.29	7.00±0.71	72.25±1.95
Внутримышечное введение бессмертника	8.00±1.15	17.85±3.0*	0.67±0.33	1.00±0.33	9.67±0.33	62.67±1.78
Пероральное введение бессмертника	13.5±1.00	17.75±3.86*	0.50±0.58	0.50±0.58	6.75±2.22	61.00±6.98
Внутримышечное введение кукурузы	13.0±2.00	18.67±2.84*	1.33±0.33	0.67±0.33	7.00±2.00	59.33±2.40
Пероральное введение кукурузы	14.0±4.04	14.67±2.60*	1.33±0.33	0.33±0.33	4.33±1.33	65.33±4.67

Примечание: Значком * отмечены различия с достоверностью $p < 0.005$.

**ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ
И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕССИВНОСТИ ОПУХОЛИ**

А.Б. Бучарская, Г.Н. Маслякова

*ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет
им.В.И. Разумовского Министерства здравоохранения России
410012 г.Саратов, ул.Б.Казачья, 112. E-mail: allaalla_72@mail.ru*

На основе анализа данных отечественной и зарубежной литературы рассмотрены генетические, морфологические, иммунологические и молекулярные прогностические факторы при злокачественных новообразованиях, многие из которых могут рассматриваться как диагностические и прогностические маркеры. Оценена возможность использования данных показателей для анализа биологической агрессивности опухолей, прогноза выживаемости и риска метастазирования злокачественных новообразований.

Ключевые слова: иммуноцитохимия, иммуногистохимия, молекулярные маркеры, биологическая агрессивность опухоли.

Genetic, morphological, immunological, and molecular prognostic factors revealed by cancer are considered. Many of them may serve as diagnostic markers. The use of these markers for assessment of tumors' biological aggressiveness, for prediction of survival and risk of metastasis is discussed.

Keywords: immunocytochemistry, immunohistochemistry, molecular markers, the biological aggressiveness of the tumor.

Одной из важных задач современной онкологии является поиск признаков и свойств опухолей, на основе которых можно было бы прогнозировать течение заболевания и определять адекватную терапию.

Важнейшими характеристиками злокачественного новообразования помимо клинической стадии является его гистологический вариант, степень дифференцировки и биологическая агрессивность. Благодаря успехам современной молекулярной биологии становятся ясными новые ключевые точки канцерогенеза и параметры опухолевых клеток, влияющие на течение болезни и ответ на терапию (Георгиев, 2000; Галицкий, 2002).

Анализ результатов лечения больных с онкологическими заболеваниями показывает, что назрела необходимость поиска новых дополнительных маркеров ранней диагностики, позволяющих прогнозировать характер течения болезни у каждого конкретного

больного. К таким новым маркерам относят показатели биологической агрессивности первичной опухоли. Оценить биологическую агрессивность первичной опухоли и ее способность к прогрессии можно, исследуя показатели ее пролиферативной активности, активности апоптоза, состояние ряда основных регуляторных рецепторов и систем. Для этого используются различные современные молекулярно-биологические методы, в том числе иммуноцито- и иммуногистохимия, гибридизация *in situ*, полимеразная цепная реакция и другие.

Иммуноцито- и гистохимия

Иммуноцитохимический анализ (ИЦХ) – метод, позволяющий проводить иммунологический анализ цитологического материала в условиях сохранения морфологии клеток. Основой ИЦХ-метода является иммунологическая реакция антигена и антитела. ИЦХ-методы позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые антигены, основываясь на их связывании с антителами. В качестве связанного с клеткой антигена выступают различные клеточные структуры: рецепторы, в т.ч. стероидных гормонов и факторов роста, белки цитоскелета, белковые продукты онкогенов и генов-регуляторов апоптоза и пр. Современные системы визуализации комплекса антиген-антитело относятся к новому поколению фермент-опосредованных методов окраски и позволяют проводить иммунологические исследования с высокой специфичностью и чувствительностью при наличии только светового микроскопа. В онкологической практике ИЦХ позволяет: выявить молекулярные структуры опухолевых клеток, ассоциированные со степенью дифференцировки, способностью к инвазии и метастазированию, чувствительностью к химиотерапии, с особенностями течения и прогнозом заболевания у конкретного пациента. ИЦХ-анализ необходимо выполнять, когда имеются непреодолимые трудности в установлении гистогенеза опухоли; при иммунофенотипировании злокачественных лимфом; для определения источника метастазирования при невыявленном первичном очаге; для определения прогноза опухолевого процесса на дооперационном этапе и коррекции схемы лечения; с целью выбора адекватной патогенетической/таргетной терапии.

Иммуногистохимический анализ (ИГХ) – один из наиболее информативных методов морфологической диагностики, в основе которого лежит визуализация и оценка результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированной ткани с помощью микроскопа, позволяющий выявлять разнообразные молекулы непосредственно в измененных болезнью тканях. Для проведения ИГХ используется материал, полученный для диагноза при биопсии или в ходе операции. Достоинством метода является возможность использования архивного материала, т.е. ранее удаленных тканей, независимо от давности

выполнения биопсии. В современной медицине – это один из основных методов диагностики опухолей. ИГХ используется для определения происхождения опухолей мягких тканей, природы опухолей головного мозга, определения формы заболеваний лимфатических узлов и костного мозга, источника метастазирования при опухолях невыясненной первичной локализации, типа новообразования (доброкачественное или злокачественное) в таких органах, как молочная железа, предстательная железа, печень, щитовидная железа. ИГХ применяется для отбора больных для специфической противоопухолевой терапии, например, у больных раком молочной железы определяются рецепторы стероидных гормонов и HER-2, в раке желудка –HER-2, CD20 – в опухолях лимфоидной ткани В-клеточного происхождения, CD117 (c-kit) – в гастроинтестинальных стромальных опухолях (Петров, 2004).

Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) – метод молекулярно-цитогенетического исследования, применяемый преимущественно в диагностике опухолей. Этот метод дает возможность обнаруживать специфические поломки в хромосомах, характерные для той или иной формы злокачественного новообразования. Преимуществом FISH по сравнению с классическим цитогенетическим анализом является то, что материалом для проведения FISH служат парафиновые блоки с тканями опухолей, полученные путем биопсии или в ходе операции не зависимо от их давности, повторное вмешательство для получения диагностического материала не требуется. Флюоресцентная гибридизация *in situ* используется в диагностике опухолей мягких тканей (саркома Юинга, синовиальная саркома и другие саркомы), опухолей лимфатических узлов и костного мозга. FISH дополняет иммуногистохимический анализ при отборе пациентов для специфического противоопухолевого лечения.

Широкое применение приобрели иммуноцито- и гистохимические методы исследования для оценки биологической агрессивности опухолей. Более чем 20 онкомаркеров в настоящее время используются в рутинной онкологической практике, около 30% из этих маркеров разработаны для выявления нейроэндокринных опухолей. В настоящее время, к сожалению, в клинических рекомендациях отсутствуют стандарты по применению конкретных молекулярных маркеров для диагностики и прогнозирования злокачественных новообразований. Рассмотрим основные группы молекулярных маркеров, используемых для оценки прогрессии злокачественных новообразований.

Регуляторы клеточного цикла

Наиболее опасным проявлением прогрессирования опухолевого образования является процесс метастазирования – образования вторичных очагов опухолевого роста. Этот процесс является основной причиной смерти онкологических больных. Чтобы приобрести способность к

метастазированию, клетка также должна обрести ряд свойств: умение проникать в глубину окружающих тканей, в том числе в кровь и лимфатические сосуды, а также способность выживать после попадания в сосуды, а затем пенетрировать и размножаться в необычном для данного типа клеток тканевом окружении и давать новый очаг роста клеток. Таким образом, способность к метастазированию складывается из комплекса признаков, наиболее существенные из которых – приобретение локомоторного фенотипа и повышение протеолитической активности, способность стимулировать ангиогенез и создавать тем самым пути эвакуации опухолевых клеток из первичного очага, подавлять апоптоз и приобретать независимость от субстрата. Запуск неопластического процесса осуществляется при участии онкогенов или генов-супрессоров. Под генами-супрессорами понимают гены, инактивация которых ведет к возникновению и/или прогрессированию новообразования. Наиболее изученными генами, вовлеченными в регуляцию клеточного цикла, являются гены супрессоры опухоли p53, Rb, и p21.

Белок p53 играет в клетке важнейшую роль и в норме присутствует во всех типах клеток. Он локализуется в ядре, где функционирует как транскрипционный фактор. p53 является основным из множества других протеинов, которые «следят» за здоровьем клетки и клеточной ДНК. p53 – дирижёр слаженной системы детекции клеточных повреждений. Когда обнаруживается нарушение, активность белка p53 помогает клетке принять решение: исправлять повреждение или же погибнуть (Hashimoto, 2000; Lane, 2002). Как транскрипционный фактор, p53 запускает транскрипцию группы генов-мишеней. Среди них наиболее важным является p21. Продукт гена p21 – негативный регулятор циклин-зависимых киназ, ферментов, которые необходимы для прохождения клеточного цикла и клеточного деления (Cooper, 1995). Стимулируя транскрипцию гена p21, p53 препятствует пролиферации клеток. Эта остановка даёт клетке время на исправление повреждений, если оно возможно. Если же произошло существенное повреждение ДНК, p53 помогает запустить клеточную гибель. Гибель клетки с серьёзно повреждённой ДНК выгодна для организма, потому что препятствует размножению клеток с опасными мутациями (Greenblatt, 1994).

Известно, что центральную роль в развитии апоптоза играет так называемый дикий тип гена – онкосупрессора wt p-53 и кодируемый им протеин p-53. При мутации ДНК происходит экспрессия гена wt p-53 и соответствующего протеина. Последний блокирует клеточный цикл в G1-S фазе и тем самым ингибирует дальнейшую репликацию повреждённой ДНК. Доказано, что при альтерации p53 нарушается способность опухоли инициировать апоптоз, а следовательно, она может становиться менее чувствительной к химиотерапевтическому воздействию (Cappello, 2002).

Мутантный ген p53 экспрессируется на высоком уровне практически во всех типах опухолей разной локализации и присутствует в небольших количествах в нормальных клетках. p53 был исследован в опухолях мозга, кишечника, молочной железы, в лейкозах и лимфомах, опухолях легкого, печени, яичника и других тканях.

Ген ретинобластомы (*Rb*) кодирует белок, который работает посредством изменения активности транскрипционных факторов. Через взаимодействие с транскрипционными факторами *Rb* способен косвенно контролировать экспрессию генов. В дополнение к этой функции, *Rb* и связанные с ним протеины обладают некоторыми менее изученными активностями. В конечном счёте *Rb* и родственные ему белки участвуют в контроле процесса клеточного деления (Geradts, 2000). Ген *Rb* существует для нормального прохождения клеточного цикла. Клетки отвечают на большое разнообразие сигналов, поступающих к ним извне и побуждающих делиться, впадать в состояние покоя или уходить в апоптоз. Нарушение этих сигналов может приводить к нерегулируемому клеточному росту, в конце концов приводящему к раку. Контроль за процессом деления клеток включает интеграцию разнообразных сигналов. Продукт гена *Rb* (pRb) в нормальном состоянии функционирует как ингибитор роста, связывая и ингибируя транскрипционные факторы. Следовательно, *Rb* может косвенно контролировать экспрессию различных генов. Некоторые из этих генов кодируют белки, запускающие клеточное деление, поэтому активность *Rb* может замедлять или останавливать клеточное деление (Herwig, 1997). Изменения в регуляторных белках, таких как *Rb*, может иметь драматические последствия для отдельных клеток и для целого организма. Помимо участия в регуляции клеточного цикла, *Rb* также играет роль в апоптозе. Апоптоз – это очень важная клеточная функция, при которой повреждённые клетки подвергаются запрограммированной гибели. Если в клетке происходят неисправимые мутации, клетка будет уничтожена посредством апоптоза. Уничтожение генетически повреждённых клеток обеспечивает элиминацию клеток, имеющих потенциал для нерегулируемого роста и, следовательно, для злокачественной трансформации. Любые нарушения клеточных функций, которые снижают или полностью исключают активацию апоптоза, могут быть опасны для клеточной популяции (Singh, 2001). Ген *Rb* может быть активирован посредством различных типов генетических нарушений. Мутации, которые полностью уничтожают функции белка (нуль-мутации) часто обнаруживаются в клетках, лишённых нормального белка *Rb*.

Множество генов было идентифицировано как протоонкогены. Многие из этих генов ответственны за передачу сигналов, ведущих к клеточному делению. Некоторые из протоонкогенов ответственны за клеточную гибель. Дефектные версии этих генов, называемые

онкогенами, могут привести к нерегулируемому клеточному делению. Такое деление может происходить в отсутствие нормальных ростовых сигналов, обеспечиваемых факторами роста. Основным признаком активности онкогенов является то, что изменения лишь в одном аллеле протоонкогена ведут к нерегулируемому росту. Этим они отличаются от генов-супрессоров опухолевого роста, в случае которых к аномальному клеточному делению ведёт дефект обоих аллелей (Копнин, 2000). Онкогены содержатся в геноме нормальной соматической клетки и кодируют выработку ферментов-киназ, факторов роста и их рецепторов и, таким образом, регулируют клеточную пролиферацию. Транслокация, амплификации или точечная мутация онкогена может привести к развитию рака. Наиболее важными онкогенами, приводящими к злокачественной трансформации уротелия мочевого пузыря, являются *gas*, *erb-B2*, *EGF/EGFR*, *c-myc* и *mdm-2*.

HER-2/neu (также называемый *erbB-2*) – это ген, кодирующий рецептор типа 2 для человеческого эпителиального фактора роста. Обнаружено, что этот рецептор в умеренных количествах присутствует на некоторых нормальных клетках, и, как следует из его названия, участвует в ответе клетки на ростовые факторы. Как показано внизу, связывание фактора в нормальных условиях может стимулировать деление клеток. Ген *HER-2/neu* амплифицирован более чем в 30% случаев рака груди у человека. Увеличение количества копий гена *HER-2/neu* приводит к усилению экспрессии белка *HER2* на мембране клетки, и, как предполагается, может вести к усилению клеточной пролиферации (Tsuda, 2001; Fontana, 2002). Амплификация гена также может влиять на ответ опухолей на лекарственные препараты, также как на способность опухоли расти и распространяться. Избыточная экспрессия этого гена делает опухоль более агрессивной, но также может сделать рак более чувствительным к химиотерапевтическим агентам (Bridges, 1999; Конесну, 2001).

К наиболее эффективным и широко применяемым маркерам прогрессии опухолей мочевого пузыря относится рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*). Это трансмембранный тирозинкиназный рецептор, связывающий эпидермальный и трансформирующий факторы роста (*EGF* и *TGF-α*). Иммуногистохимические исследования показали прямую зависимость между экспрессией *EGFR* и степенью клеточной атипии, а также стадией роста опухоли (Bazley, 2005). *EGFR* экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток и участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки (Сао, 2000). Гиперэкспрессия *EGFR* опухолевыми клетками, как правило, ассоциируется с поздними стадиями и метастатическим фенотипом заболевания и, соответственно, коррелирует с плохим прогнозом (Поляновский, 2012).

Антигены, связанные с пролиферацией

Пролиферативная активность клетки может быть оценена при помощи различных методик. К ним относятся подсчет количества митозов, исследование числа Ki 67 позитивных клеток, выявление антигена ядра пролиферирующей клетки (PCNA) и другие.

Наиболее часто среди маркеров пролиферации используются такие антигены как PCNA и Ki-67. Известно, что антиген пролиферирующего клеточного ядра PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) является мультифункциональным белком, который экспрессируется в делящихся клетках в конце G1-фазы и в первой трети S-фазы, он участвует не только в пролиферации клеток, но и в репарации ДНК после ее повреждения (Kato, 2002; Лоран, 2008), что делает данный антиген условно специфичным к клеточному циклу, так как восстановление ДНК может осуществляться в фазе покоя (McCormick, 1992). В тканях с низкой пролиферативной активностью, по данным литературы, экспрессия антигена минимальна.

Другим антигеном, достоверно ассоциированным с фазами клеточного цикла, является Ki-67. Экспрессия этого белка наступает во время фазы G1, нарастает в течение клеточного цикла и резко уменьшается в фазе митоза (Bruno, 1992). Этот белок, в отличие от PCNA, не участвует в репарации ДНК. Таким образом, экспрессия Ki-67 дает возможность идентифицировать клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы покоя G0 (Holt, 1997; Quintero, 2006). Продукты гена Ras участвуют в киназных сигнальных путях, контролирующих транскрипцию генов, которые, в свою очередь, регулируют рост и дифференцировку клеток (Ruddon, 1995). Следовательно, избыточная экспрессия ras и его амплификация могут приводить к неограниченной пролиферации клеток, что является основным шагом в развитии рака (Ahmadian, 2002).

Маркеры ангиогенеза

Ангиогенез является непременным условием опухолевого роста и метастазирования. Иммуногистохимическая окраска клеток эндотелия сосудов может быть использована для количественного анализа степени васкуляризации новообразования. Выделено несколько факторов стимуляторов ангиогенеза, наиболее информативным является определение васкулоэндотелиального фактора роста VEGF (Ferrara, 2002; Patard, 2009).

Маркеры апоптоза

Апоптоз регулируется семействами протеинов, которым относятся системы bcl 2 и bax. Bcl-2 (от B cell lymphoma gene-2 – ген В-клеточной лимфомы) – это белки, ассоциированные с мембраной и её активностью. Белок bcl-2 является составной частью сложной системы сигналинга, контролирующего апоптоз. Апоптоз (запрограммированная клеточная

смерть) может быть индуцирован множеством различных сигналов, включая повреждения ДНК, не подлежащие репарации. Bcl-2 работает для предотвращения апоптоза (Strasser, 1997).

Следовательно, его избыточная экспрессия может защитить повреждённые клетки от апоптоза. Это может привести к продолжению деления мутировавших клеточных линий и затем к раку. Также гиперэкспрессия Bcl-2 может вносить свой вклад в метастазирование (Fernandez, 2002; Gross, 2001).

Другой системой, регулирующей апоптоз, является комплекс Fas, который представлен трансмембранными белками и относится к рецепторам фактора некроза опухоли. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров приводит к активации лигандов Fas на поверхности клетки. Установлено, что альтерации гена Fas могут приводить к утрате способности клетки к апоптозу и являться прогностически неблагоприятным признаком (Reichmann, 2002).

Маркеры клеточной адгезии

Для дальнейшей прогрессии и индукции метастазирования опухоли клетки ее должны получить способность отделяться от исходной клеточной массы. Было обнаружено, что во многих злокачественных опухолях нарушается работа кадгерин-катениновой системы. Это система трансмембранных рецепторов, вовлеченных в организацию адгезионных соединений, являющихся опухолевыми супрессорами, утрата функции которых приводит к злокачественной трансформации. Комплекс, обеспечивающий прочность связей в опухолевом конгломерате, состоит из белков Е-кадгерина и α - и β -катенинов. При повреждении одного из компонентов этой системы она разрушается, и клетки приобретают возможность отделиться от агрегата. Важность поддержания межклеточной адгезии была показана на модели рака поджелудочной железы у мышей, когда нарушение экспрессии Е-кадгерина привело к ранней инвазии и метастазированию (Иванов, 2001).

Подавить злокачественность раковых клеток, в частности, их способность к метастазированию, возможно путем введения в геном конструкции, содержащей Е-кадгерин, который будет обеспечивать выработку больших количеств этого белка. На основании экспериментальных и клинических данных предпринимаются попытки использовать определение степени экспрессии Е-кадгерина у онкологических больных в целях прогнозирования рецидивов. Восстановление нормальных адгезивных функций кадгерин-катенинового комплекса является задачей антиинвазивной терапии опухолей.

Отделившаяся от агрегата опухолевая клетка для успешного метастазирования должна приобрести аппарат для разрушения окружающей среды. Такое разрушение выполняется гидролитическими ферментами, гиалуронидазами и различными протеиназами.

Злокачественные клетки продуцируют гораздо больше протеиназ, чем нормальные клетки, происходящие из той же ткани. Усиление активности протеиназ за счет включения в работу генов, ответственных за их синтез, дает опухолевым клеткам преимущество – они могут захватывать новые территории, вставая в окружающие ткани. Определение уровня протеиназ и их ингибиторов в опухолях уже сейчас является медицинским тестом для прогноза заболевания и определения интенсивности необходимой терапии. Примерами активно исследуемых протеиназ являются матриксные металлопротеиназы, усиливающие деградацию внеклеточного матрикса (Gialeli, 2011).

Таким образом, в настоящий момент существует множество данных о различных генетических, морфологических, иммунологических и молекулярных прогностических факторах при опухолях почки. Некоторые из них могут использоваться как диагностические и прогностические маркеры. Однако ни один из авторов не берет на себя смелость заявить однозначно об универсальности изученного им фактора. Использовать эти молекулярные, иммуногистохимические, генетические и морфологические показатели необходимо в совокупности с классическими факторами прогноза выживаемости и риске метастазирования при злокачественных опухолях. Остаются большие перспективы в изучении комбинаций данных признаков и оценке их прогностического значения для анализа биологической агрессивности злокачественных новообразований.

Список литературы

- Галицкий В. А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов // Вопросы онкологии. 2003. Т. 49. № 3. С. 278–293.
- Георгиев Г.П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей // Соросовский образовательный журнал (биология). 2000. № 11. С. 17–22.
- Иванов Д.Б., Филиппова М.П., Ткачук В.А. Структура и функции классических кадгеринов // Биохимия. 2001. Т. 66. № 10. С. 1450–1464.
- Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров // Биохимия. 2000. Т. 65. № 1. С. 2–27.
- Лоран О.Б., Франк Г.А., Серегин А.В., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Серегин А.А., Шустикский Н.А. Факторы апоптоза и пролиферации при раке почки // Онкоурология. 2008. № 2. С. 16–21.
- Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: Титул, 2004. 456 с.
- Поляновский О.Л., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. ERBB Онкогены – мишени моноклональных антител // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 3. С. 289–311.
- Ahmadian M.R. Prospects for Anti-Ras Drugs // British Journal of Haematology. 2002. V. 116. № 3-I. P. 511–518.
- Bazley L.A., Gullick W.J. The epidermal growth factor receptor family // Endocr. Relat.Cancer. 2005. V. 12. Suppl. 1:S. P. 17–27.

Bridges A.J. The rationale and strategy used to develop a series of highly potent, irreversible, inhibitors of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases // *Curr. Med. Chem.*, 1999. V. 6. P. 825–843.

Bruno S. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells // *Cell. Prolif.* 1992. V. 25. P. 31–40.

Cao L., Yao Y., Lee V., Kiani C., Spaner D., Lin Z., Zhang Y., Adams M. E., Yang B. B. Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion // *J. Cell. Biochem.* 2000. V. 77. P. 569–583.

Cappello F., Bellafigliore M., Palma A., Bucchieri F. Defective apoptosis and tumorigenesis: role of p53 mutation and Fas/FasL system dysregulation // *Eur. J. Histochem.* 2002. V. 46. P. 199–208.

Cooper G.M. *Oncogenes*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1995.

Fernandez Y., Gu B., Martinez A., Torregrosa A., Sierra A. Inhibition of apoptosis in human breast cancer cells: role in tumor progression to the metastatic state // *Int. J. Cancer.* 2002. V. 101. P. 317–326.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. V. 2. P. 795–803.

Fontana L.O., Garcia G.F., Areas M.S.I. et al. The expression of p53 and c-erb-2 in transitional cell carcinoma of the kidney pelvis and ureter and its relation to tumor progression and survival // *Arch. Esp. Urol.* 2002. V. 55. № 7. P. 792–796.

Geradts J., Ingram C.D. Abnormal expression of cell cycle regulatory proteins in ductal and lobular carcinomas of the breast // *Modern Pathology.* 2000. V. 13. № 9. P. 945–953.

Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting // *FEBS J.* 2011. V. 278. № 1. P. 16–27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.

Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 4855–4878.

Gross A. BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program // *IUBMB Life.* 2001. V. 52. № 3–5. P. 231–236.

Hashimoto H., Sue Y., Saga Y. et al. Roles of p53 and MDM2 in tumor proliferation and determination of the prognosis of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter // *Int. J. Urol.* 2000. V. 7. № 12. P. 457–463.

Herwig S., Struss M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation, and apoptosis // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 246. P. 581–601.

Holt P.R., Moss S.F., Kapetanakis A.M. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? // *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 1997. № 6. P. 131–135.

Kato T., Kameoka S., Kimura T. et al. C-erbB-2 and PCNA as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer // *Anticancer Res.* 2002. V. 22, 2B. P. 1097–1103.

Konecny G., Fritz M., Untch M., Lebeau A., Felber M., Lude S., Beryt M., Hepp H., Slamon D., Pegram M. Her-2/neu overexpression and in vitro chemosensitivity to CMF and FEC in primary breast cancer // *Breast Cancer Research and Treatment.* 2001. V. 69. P. 53–63.

Lane D.P. et al. Regulation of p53 stability. The role of Mdm2 and nuclear export // CRC Laboratories. University of Dundee, 2002.

McCormick D., Hall P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen // *Histopathology*. 1992. V. 21. P. 591–594.

Patard J.J., Rioux-Leclercq N., Masson D. et al. Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma // *Br. J. Cancer*. 2009. V. 101. № 8. P. 1417–1424.

Quintero A., Alvarez-Kindelan J., Luque R.J., Gonzalez-Campora R., Requena M.J., Montironi R., Lopez-Beltran A. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder // *J. Clin. Pathol.* 2006. V. 59. №1. P. 83–88.

Ruddon R.W. Cancer Biology. New York: Oxford University Press, 1995.

Singh P., Chan S.W., Hong W. Retinoblastoma protein is functionally distinct from its homologues in affecting glucocorticoid receptor-mediated transcription and apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. V. 276. P. 13762–13770.

Strasser A., Huang D.C., Vaux D.L. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1333. № 2. P. 151–178.

Tsuda H., Akiyama F., Terasaki H., Hasegawa T., Kurosumi M., Shimadzu M., Yamamori S., Sakamoto G. Detection of Her-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma // *Cancer*. 2001. V. 92. № 12. P. 2965–2974.

**ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ
ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ
НА МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA***

А.А. Голубев^{1,2}, А.Ю. Прилепский¹, В.А. Богатырев^{1,2}

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Саратовский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»,
410012 г. Саратов, ул. Астраханская, 83
zet111b@gmail.com

Разработана диагностическая тест-система определения цитотоксичности наноматериалов для солоноводной микроводоросли *Dunaliella salina*, основанная на колориметрических измерениях, позволяющая оценивать гибель клеток и замедление скорости роста культуры в концентрационных рядах различных токсикантов. Метод основан на фотодеструкции хлорофилла поврежденных клеток, что дает возможность оценивать жизнеспособность популяции по обесцвечиванию клеточной суспензии. Совместное использование спектрофотометрии и флуоресцентной микроскопии позволяют оценивать динамику численности и жизнеспособности популяции и в результате получать основные токсикометрические характеристики.

Ключевые слова: цитотоксичность, наноматериалы, *Dunaliella salina*, спектрофотометрия

We report a novel diagnostic test system for evaluation the nanomaterial's toxicity on halophile green microalgae *Dunaliella salina* based on colorimetric measurements enabling to estimate the cell death and growth-rate inhibition in microalgae suspension for serial dilutions of several toxicants. The principle of the method is the photodegradation of chlorophyll from the damaged cells resulting in the cell's suspension discoloration, which enables to estimate the microalgae population viability. The combined use of spectrophotometry and fluorescence microscopy allows the estimation of population dynamics and population viability and achievement of the main toxicometric parameters as a result.

Key words: cytotoxicity, nanomaterials, *Dunaliella salina*, spectrophotometry

Плазмонно-резонансные наноматериалы используются в нанобиотехнологии и в биомедицине, где они применяются для биоимиджинга и в тераностике (выявление и терапия раковых опухолей), благодаря возможности настройки спектрального положения и амплитуды плазмонного резонанса за счет изменения природы металла, размера, формы, структуры частиц и их диэлектрического окружения (Хлебцов, 2007). Кроме того, их активно используют для адресной доставки лекарственных соединений, генетического материала, антигенов к клеткам, органам и тканям животных и растений.

Наибольшее распространение получили наночастицы коллоидного золота различных форм, размеров и поверхностной функционализации. Предпочтение золоту отдается в связи с его наименьшей из известных наноматериалов собственной цитотоксичностью (Khlebtsov, 2011). Особый интерес в нанотоксикологии представляет серебро, как вещество с существенно большей, чем у золота, растворимостью, заметно увеличивающейся при попадании в виде наночастиц в клетку в условиях кислой среды лизосом. Благодаря этому свойству серебряные наночастицы проявляют эффект «троянского коня» (Li, 2014). В настоящее время доступен широкий выбор методов синтеза анизотропных наночастиц с узкими границами распределения по размерам и форме частиц. Выбор одного из этих методов зависит от ряда соответствующих экспериментальных параметров, определяющих процессы зарождения и роста в синтезе коллоидной частицы, благодаря чему возможен контроль размера и степени разветвленности полученных наночастиц. Для придания несферической формы плазмонно-резонансным наночастицам широко применяются катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ), в частности, цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

В большинстве токсикологических работ отмечается токсичность ЦТАБ-содержащих наноматериалов (Tarantola, 2009), хотя механизмы действия и токсические величины могут быть различны для различных клеток и зависят, по всей видимости, от тканевой (клеточной) дифференциации. Тем не менее, общей для всех механизмов цитотоксического действия ЦТАБ является мембранная направленность.

В связи с этим, в качестве модельного объекта было решено использовать культуру клеток с хорошо развитым мембранным аппаратом. Наш выбор пал на одноклеточные зеленые микроводоросли *Dunaliella salina* (Рис. 1), схожие с животными клетками отсутствием клеточной стенки. Водоросли этого рода отличаются интенсивным ростом и простотой поддержания альгологически чистых культур, обусловленной их высокой солеустойчивостью, связанной с природными местообитаниями в соленых озерах в гиперосмотических условиях (Масюк, 1973). Возможность оценки жизнеспособности всей микропопуляции водорослей и отдельных организмов-клеток по

состоянию зеленого пигмента хлорофилла с помощью наименее инвазивных физико-химических методов – фотометрии, флуориметрии и микроскопии (даже без использования витальных красителей) делает этот объект весьма привлекательным для нанотоксикологических исследований.

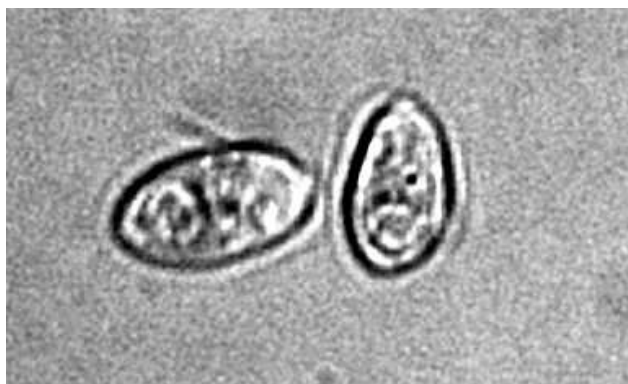


Рис.1.*Dunaliella salina*.

Определение токсичности наноматериалов для микроводорослей *D. salina* проводили в культивационных 96-луночных планшетах с плоским дном. Первоначально в лунки вносили токсиканты в серии разведений (последовательных двукратных, либо с фиксированным шагом 10 – 20%) культуральной средой в объеме 150 мкл в триплицированных рядах. В последние лунки рядов токсикант не вносили и использовали в качестве отрицательного контроля.

Для инокуляции микроводоросли осаждали центрифугированием при 150 g 5 мин и редиспергировали в свежей культуральной среде таким образом, чтобы после добавления в лунку 150 мкл суспензии микроводорослей $D_{690} \approx 0.1$, что соответствует концентрации клеток около $2 \text{ мкмоль} \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$.

Далее планшеты инкубировали в лабораторной факторостатной камере, представляющей собой стеклянную ванну, заполненную дистиллированной водой на глубину ~0.5 см, освещаемую снизу люминесцентными лампами дневного света, создающими поток $50 - 60 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$.

Через определенные промежутки времени образцы просматривали на микроскопе в режиме фазового контраста и люминисценции. Захват изображений осуществляли с помощью цифровой камеры, фиксируя количество подвижных (трассированное изображение), живых (красная флуоресценция хлорофилла) и мертвых (голубая флуоресценция) клеток в фокальной плоскости дна лунки.

Далее следовала регистрация оптической плотности, которую проводили с помощью планшетного спектрофотометра, после чего планшеты возвращали в факторостатную камеру. По истечении полного времени экспозиции, стандартно 48 ч, клетки фиксировали, добавляя в каждую лунку по 10 мкл 10% глутарового альдегида. После оседания проводили подсчет живых и мертвых клеток, как описано выше.

Планшетный вариант измерения жизнеспособности микроводорослей по изменению оптической плотности суспензии в области красного максимума поглощения хлорофилла позволяет избегать процедуры экстракции этого пигмента и оценивать кинетику его фотодеструкции, сопровождающую гибель клеток. Интактные клетки сохраняют свою окраску, при этом концентрация зеленого пигмента пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. Это позволяет судить о количестве живых организмов и кинетике развития популяции.

Результат гибели клеток, регистрируемый фотометрическим способом, надежно проявляется уже через 24 ч наблюдений. В лунках, где произошла гибель клеток, взвесь обесцвечивается. В случае лизирующих токсикантов под микроскопом можно наблюдать вытекание внутриклеточного матрикса за видимые границы клеток и довольно быстрое выгорание красной флуоресценции.

В качестве токсикантов были использованы два стандартных поллютанта: перекись водорода и формальдегид, три препарата серебра: нитрат серебра, протеинат серебра и коллоидное серебро, ЦТАБ и золотые наносферы, наностержни и нанозвезды.

В результате было показано, что токсичность ЦТАБ-содержащих препаратов золотых наночастиц различной морфологии (наносфер, нанозвезд и наностержней) определяется, главным образом, содержанием свободного ПАВ, а не самими частицами, что согласуется с литературными данными, полученными на культурах клеток животных.

Исследование различных форм препаратов серебра, включая коллоидные наночастицы, показало, что токсическое действие на микроводоросль *D. salina* уменьшается ряду нитрат серебра > протеинат серебра >> наночастицы серебра. Этот результат согласуется с данными других методик, показывающих большую токсичность ионов серебра по сравнению с серебреными наночастицами.

Для прозрачных растворов токсикантов (например, перекиси водорода и формальдегида) применение метода не вызывает никаких проблем и дает показатели токсичности, сопоставимые с литературными данными, полученными другими методами.

После детальной проверки и сравнения с другими методами предложенная тест-система может оказаться полезным инструментом для массового скрининга токсичности наноматериалов различной природы.

Список литературы

Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования. Киев: Наукова думка, 1973. 244 с.

Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н. Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований // Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 3–4. С. 69–86.

Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. № 3. P. 1647–1671.

Li N., Zhao P., Astruc D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity // Angew. Chem., Int. Ed. 2014. V. 53. P. 2–36.

Tarantola M., Sunnick E., Schneider D., Janshoff A. Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility // AcsNano. 2009. V. 3. № 1. P. 213–222.

ДИНАМИКА РОСТА ПЕРЕВИВАЕМОЙ САРКОМЫ И ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Т.П. Байтман, Н.А. Наволокин, Н.В. Полуконова

*Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского*

E-mail: bit.t@mail.ru, navolokin1@rambler.ru, polukonovanv@yandex.ru

Выявлены эффекты водного раствора сухого спиртового экстракта аврана лекарственного на лабораторных крыс с перевиваемой саркомой-45 при внутримышечном введении. Под действием экстракта при внутримышечном введении в саркоме возникали обширные зоны некроза и участки фиброзирования опухоли.

Ключевые слова: авран лекарственный, саркома мягких тканей

We have explored the effects of aqueous solution of hedgehyssop's dry alcoholic extract on laboratory rats with transplanted sarcoma-45. There have arised vast necrotic zones and areas of tumour fibrosing under the influence of the extract administered intramuscularly in the sarcoma.

Key words: hedgehyssop (*Gratiola officinalis*), sarcoma of soft tissues

Введение

Саркомы мягких тканей (СМТ) составляют 0.7% злокачественных новообразований взрослых и относятся к наиболее злокачественным опухолям. В Российской Федерации число пациентов с этим заболеванием ежегодно составляет 4.5-5 тыс. До настоящего времени доступных средств для лечения СМТ, обладающих высокой эффективностью и в то же время безопасных для организма, не найдено. Так, в нашей стране в 2007 г. по поводу СМТ проходили лечение 3245 человек, в течение года умерли 3085. В США ежегодно диагностируется около 5700 случаев СМТ, из которых 4200 кончаются смертью больных (<http://eesg.ru/4specialists-sarcomasofttissues>). Наиболее часто СМТ отмечаются в возрасте 20 – 60 лет (Брюсов, 2012). Вышеизложенные факты подтверждают актуальность и значимость поиска новых лекарственных средств лечения СМТ, обладающих сравнительно низкой токсичностью, к которым, в первую очередь, относятся средства на основе лекарственного растительного сырья.

В настоящее время выяснены следующие направления действия флавоноидов – растительных полифенолов: иммуномодулирование, антиоксидантное и мембранопротекторное действие; снижение

антиокислительной активности липидов опухолевых клеток (снижение их жизнеспособности); обезвреживание и удаление токсинов, в большом количестве накапливающихся при раковых заболеваниях; торможение ангиогенеза (Тараховский и др., 2013).

Экстракт аврана лекарственного (травянистого растения семейства Норичниковые), полученный способом, позволяющим существенно снизить его токсичность, обогащен биофлавоноидом кверцетином и обладает выраженной противоопухолевой активностью в отношении перевиваемого рака печени крыс РС-1, а также выраженным антиканцерогенным действием (Полуконова и др., 2011, 2013; Navolokin et al., 2012; Наволокин, Павлова, 2012; Наволокин и др., 2013; Курчатова и др., 2014).

Цель нашей работы – выявить эффекты раствора сухого спиртового экстракта из аврана лекарственного на лабораторных крысах с перевиваемой саркомой-45 при внутримышечном введении.

Материал и методика

Материалы: самцы и самки белых лабораторных крыс массой 153.5 ± 18.6 и 104.8 ± 12.3 г соответственно; водный раствор сухого экстракта аврана; саркома-45 (РОНЦ им. Н.Н.Блохина).

Использованы следующие методы: гистологические: окраска гематоксилином и эозином, по Романовскому-Гимзе; морфометрический; гистохимические; наблюдение и сравнение поведения животных; статистические. При оценке динамики роста саркомы нами был использован индекс роста опухоли.

Дизайн эксперимента. Эксперимент проводился в соответствии с руководствами по доклиническим исследованиям лекарственных средств (Хабриев, 2005). В ходе эксперимента 0.5 мл опухоли перевивалось белым лабораторным крысам в межлопаточную область. Крысы были разделены на 4 группы по 5 животных в каждой: контрольная и экспериментальная группы самцов и контрольная и экспериментальная группы самок.

Первое введение экстракта производилось в день перевития опухоли и продолжалось каждые 2 суток до выведения животных из эксперимента. В течение 20 суток мы наблюдали за поведенческими реакциями крыс, динамикой температуры и массы тела, роста объема опухоли. Затем животные были выведены из эксперимента путем быстрой декапитации, произведено вскрытие, измерение массы, гистохимический и гистологический анализ внутренних органов.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе динамики роста саркомы установили, что через 15 дней от начала эксперимента в группе самок при введении экстракта аврана начинается значимое замедление роста опухоли (на 225.4% по объёму),

которое к концу эксперимента достигает 251.7% по объему. Индекс торможения роста опухоли составил 60%. В группе самцов при введении экстракта аврана регресс опухоли наблюдается с 17 дня (на 397.7%) и к концу эксперимента составляет 584.47%. Индекс торможения роста опухоли – 82.7%.

В опытной группе была выявлена большая, чем в контрольной, динамика массы тела. При этом и в группе самок, и в группе самцов при введении экстракта с 15 дня отмечался рост массы тела, продолжавшийся до конца эксперимента.

Динамика температуры при введении экстракта также была более выражена.

Как у самок, так и у самцов опытной группы (у самок – в большей степени) чаще наблюдалась гиподинамия.

Для представителей опытной группы более характерным было положение туловища над подстилкой и горизонтально подстилке (особенно для самок), в то время как крысы контрольной группы чаще активно перемещались по каркасу клетки.

Наименьшая степень каталепсии наблюдалась у самок опытной группы. При этом и у самок, и у самцов опытной группы повышение степени каталепсии приходится на 15 день эксперимента.

С 15 – 16 дня эксперимента и у самок, и у самцов при введении экстракта было отмечено замедление и затруднение дыхания, чего не наблюдалось в контрольной группе.

У самок опытной группы чаще, чем у самок контрольной группы, отмечалось сужение глазных щелей. У самцов сужение глазных щелей было выявлено лишь на 13 день эксперимента – в контрольной группе.

Кроме того, на фоне введения экстракта было выявлено лучшее состояние шерстного покрова.

Морфометрические исследования показали, что возможен положительный эффект экстракта для печени. В экспериментальной группе размеры печени ($K=2.800\pm0.896$) значимо неотличимы от размеров печени здоровых животных без опухоли. В то время как в группе животных с опухолью без воздействия по сравнению с группой здоровых животных размеры печени увеличены в 2 раза ($K=5.04$).

Патоморфоз саркомы соответствовал 3 степени: обширные зоны некроза занимали от 80 до 90% площади препарата, обнаруживались участки фиброзирования опухоли и формирования капсулы, чего не наблюдалось в группе сравнения.

Выводы

Выявлена противоопухолевая активность экстракта аврана в отношении саркомы-45.

В группе самок через 15 дней от начала эксперимента при введении экстракта аврана достоверно замедляется рост саркомы (на 225.4% по объёму), к концу эксперимента - на 251.7% по объёму. ИТ у самок = 60%.

В группе самцов с 17 дня от начала введения экстракта аврана наблюдается регресс опухоли (на 397.7%), к концу эксперимента – на 584.47%. ИТ у самцов = 82.7%.

Впервые описаны поведенческие реакции у животных в результате токсического действия саркомы. Некроз саркомы под действием экстракта аврана приводит к снижению активности животных.

Под действием экстракта аврана при внутримышечном введении в саркоме возникают обширные зоны некроза и участки фиброзирования опухоли.

В экспериментальной группе размеры печени ($K = 2.80 \pm 0.89$) значимо не отличимы от размеров печени здоровых животных без опухоли. В то время как в группе животных с опухолью без воздействия, по сравнению с группой здоровых животных, размеры печени увеличены в 2 раза ($K = 5.02 \pm 0.63$).

Список литературы

Брюсов П. Г., Зубарев П.Н. Клиническая онкология. Учебное пособие. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2012. 464 с.

Наволокин Н.А., Павлова А.В. Морфологические изменения в мышцах у лабораторных крыс и определение токсичности при введении экстракта аврана // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2012. Т. 2. Вып. 2. С. 82–83.

Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б., Дурнова Н. А. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени Рс-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9. № 2. С. 213–220.

Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with trasplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. V. 1. № 2. 0203.

Курчатова М. Н., Дурнова Н. А., Полуконова Н. В. Влияние экстрактов, содержащих биофлавоноиды, на индукцию микроядер диоксидом в эритроцитах крови беспородных белых мышей // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. № 2. С. 58–65.

Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Дурнова Н.А. Патент Российская Федерация. 2482863. Способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). 2013.

Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной

композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiolaofficinalis*L.) // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 165–173.

Полуконова Н.В., Меркулова Е.П., Дурнова Н.А., Романтеева Ю.В., Бородулин В.Г. Изучение антиоксидантной активности экстракта аврана лекарственного на крысах с перевитой опухолью печени РС-1 // Тезисы докладов научно – практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, Крым, Украина 23-28 мая 2011 г. Киев, 2011. С. 585.

Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronobook, 2013. 310 с.

Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.

<http://eesg.ru/4specialists-sarcomasofttissues>

МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ В КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

**А.Ю. Прилепский¹, О.А. Бибикова², А.А. Голубев^{1,3},
В.А. Богатырев^{1,3}, Б.Н. Хлебцов¹**

¹ *Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13*

² *Oulu university*

90570 Oulu, Pentti Kaiteeran katu 1, Finland

³ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Саратовский государственный
университет имени Н.Г.Чернышевского»*

410012 г. Саратов, ул. Астраханская, 83

E-mail: prilepskii@gmail.com

Флуоресцентные красители являются известным средством диагностики в различных областях биологии и медицины. В настоящее время существует большое число красителей, поставляемых как в виде отдельных химических реактивов, так и в виде наборов, так называемых китов. Большое разнообразие зачастую приводит к сложности выбора того или иного красителя под конкретные исследовательские нужды. В статье дается краткий обзор принципов работы флуоресцентных красителей, а также современные тенденции развития этой области.

Ключевые слова: флуоресценция, флуоресцентный краситель, акридиновый оранжевый.

Fluorescent dyes are well-known diagnostic tool for various fields of biology and medicine. Currently there are a large number of dyes supplied as individual chemical reagents and in the form of kits. This often leads to complexity of choice of the dye for specific research needs. This article gives a brief overview of the principles of the fluorescent staining, as well as modern trends in this area.

Keywords: fluorescence, fluorescent dye, acridine orange.

Флуорохром или флуоресцирующий краситель – общее название химических веществ, используемых для контрастирования прозрачных биологических образцов (Valeur, 2001). Такие вещества, в отличие от обычных поглощающих, расходуют часть поглощенной световой энергии на свечение. Длина волны излучаемого света зависит от типа красителя и всегда больше, чем длина волны падающего света, поскольку энергия такой волны меньше (часть энергии расходуется на тепловые эффекты).

Интенсивность флуоресценции зависит от длины волны, так как каждый флуорохром имеет максимум на кривой возбуждения. Облучение таким светом приводит к наибольшей флуоресценции. Компенсировать несоответствие длин волн падающего света и максимума возбуждения можно с помощью повышения интенсивности облучения. Помимо этого интенсивность флуоресценции зависит от силы флуорохрома, определяемой квантовой эффективностью (Hogobin, 1982).

О применении флуоресцентных красителей как эффективного средства для определения жизнеспособности клеток было известно еще в 80-е годы прошлого века (Kenneth, 1985). Так, флуоресцеиндиацетат (FDA) и пропидий йодид (PI) используются для контрастирования мертвых и живых клеток.

Одной из проблем при использовании красителей является их выгорание. Поэтому микроскопические исследования необходимо проводить либо со свежеприготовленными образцами, либо использовать специальные защитные растворы для сохранения флуоресценции. В качестве стандартного защитного раствора может применяться глицерин, который служит одновременно и просветляющим агентом. В настоящее время существуют коммерческие продукты на основе глицерина, например, Prolong Gold AntiFade. Правильно приготовленные образцы могут храниться в специальном светонепроницаемом боксе в холодильнике при +4°C достаточно долгое время.

Поглощение красителя обычно является следствием сродства ткани к красителю или реактива к ткани. Компонент ткани имеет высокое сродство к красителю, если компонент этот интенсивно окрашивается (исходя из практики). В данном случае, этот термин описывает тенденцию красителя к переходу из раствора в компонент (Goldstein, 1974). Степень сродства ткани к красителю зависит от многочисленных факторов, вовлеченных в процесс окрашивания, в том числе от взаимодействия между тканью и красителем, между растворителями, между красителем и растворителем и взаимодействий внутри красителя. Иногда красители попадают в живые организмы путем, отражающим биохимические особенности и физиологическую активность живой клетки или организма. Такие красители используются для окрашивания клеточных мембран, эндосом и пр.

Вопрос избирательности окрашивания относится к фундаментальным вопросам гистохимии и ответ на него не является тривиальным (Valeur, 2001). Как сродство красителя, так и число мест связывания могут меняться. Понимание красящих систем часто требует рассмотрения паттернов сродства. Отрицательно заряженные кислые красители имеют высокое сродство к структурам ткани, несущим катионные заряды, но низкое сродство к структурам, несущим отрицательные группы; для основных красителей наблюдается обратная

ситуация. Это дает двуцветные области окрашивания. Важную роль играет рН. Помимо этого на сродство влияет изменение концентрации неорганических солей.

Скорость поглощения реактива также важна. Избирательность требует коротких периодов окрашивания, в течение которых окрашиваются только быстро окрашиваемые компоненты. Если же время окрашивания увеличить, могут также окраситься дополнительные структуры, окрашивание которых не требуется.

Даже в случаях, когда краситель относится к избирательным, тем не менее, он может дать селективное окрашивание.

Модификация ткани перед окрашиванием также влияет на конечный результат. Модификации включают в себя фиксацию, воздействие которой на окрашивание во многом случайно, техники блокировки и экстракции, предназначенные для изменения окрашиваемых паттернов. Фиксация переводит растворимые компоненты в нерастворимые и призвана оградить препараты от «посмертных» изменений в тканях, изменений в процессе окрашивания, воздействия бактерий и грибов. Различные фиксаторы, однако, оказывают различное воздействие на материал. К примеру, многие липиды плохо сохраняются при фиксации формалином и активно экстрагируются при фиксации спиртом. Окрашивание липидов после спиртовой фиксации, таким образом, неэффективно.

Особого внимания заслуживает флуоресцентный витальный краситель акридиновый оранжевый (АО). Он имеет широкое применение, начиная от исследования количества и структур нуклеиновых кислот, изучения жизнеспособности клеток и заканчивая апоптозом, изучением злокачественных опухолей. Такое широкое применение оказалось возможным благодаря различным флуоресцентным свойствам молекул АО в виде мономеров, агрегатов и в комплексах с ДНК и РНК. Так, квантовый выход флуоресценции мономеров АО, сорбированных двуспиральными структурами нуклеиновых кислот, значительно увеличивается благодаря интеркаляции мономеров АО в такие структуры: они ярко флуоресцируют в зеленой области спектра. Кроме того, из-за межмолекулярного, главным образом гидрофобного, взаимодействия мономеров АО возникает явление метахромазии, т.е. длинноволновый сдвиг спектров флуоресценции агрегатов АО по сравнению с таковыми для мономеров АО (Johnson, 2003). Метахромазию АО можно наблюдать при росте его концентрации, при сорбции АО на близко расположенных местах сорбции, когда возможны межмолекулярные взаимодействия мономеров АО, и в ряде подобных случаев. Примером является флуоресценция АО в красной области спектра при сорбции его на фосфатных группах однотяжевых нуклеиновых кислот, в частности РНК. Явление метахромазии АО наблюдается также при взаимодействии его

молекул в замкнутых мембранных пузырьках с кислым содержимым (например, лизосомах).

Одним из применений АО стала техника смешанных меток для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) и флуоресцентной микроскопии. Сами по себе золотые частицы не видны в обычный световой микроскоп и, ввиду слабой люминесценции, плохо видны при КЛСМ. Единственным способом визуализировать наночастицы является методика темного поля. Одной из дополнительных возможностей для исследования локализации золота во внутриклеточных органеллах является конъюгация золотых наночастиц с флуоресцентным красителем. Было установлено, что адсорбция АО на поверхности наночастиц золота значительно усиливает светимость наночастиц в режиме темного поля. Дополнительно, адсорбированный на частицах АО полностью тушится, в результате чего на флуоресцентных изображениях черные области явно свидетельствуют о наличии там золотых агрегатов.

Помимо готовых коммерческих продуктов, в последнее время набирает популярность идея о приготовлении флуоресцентного красителя с любыми, заранее заданными свойствами прямо в лаборатории.

Зачастую флуоресцентные красители и наборы для цитофлуориметрического окрашивания имеют высокую стоимость, ограниченный срок хранения и эксплуатации, особенно в виде рабочих растворов. В силу этого, разработка новых типов флуоресцентных красителей, синтез и применение которых были бы возможны при среднем уровне технической оснащённости лаборатории, а свойствами которых возможно было бы управлять в процессе синтеза, является очень актуальной. Нами был воспроизведен оригинальный метод, предложенный Zhang с соавторами (Zhang et al., 2014; Khlebtsov, 2014). Описанный метод синтеза прост и проводится в один этап, время приготовления красителя около 1 часа. Нами были получены спектры возбуждения данного красителя, а также предложена схема, объясняющая принцип синтеза данного вещества. Полученный краситель достаточно устойчив даже при хранении на свету при комнатной температуре. Однако для достижения наилучших результатов его необходимо лиофильно высушивать и хранить при -20°C , при этом время хранения такого высушенного препарата может составлять несколько месяцев.

Данный краситель в немодифицированном виде может применяться для окрашивания как животных, так и растительных клеток. В животных клетках наибольшее накопление красителя наблюдается в области мембран и вакуолей, однако присутствуют клетки, окрашенные полностью, включая ядро. В растительных клетках окрашиваются преимущественно вакуоли. По результатам наблюдений, данный краситель обладает повышенной стойкостью к выгоранию и нетоксичен как для животных, так и для растительных клеток. Дополнительно,

флуоресцирующий комплекс может быть модифицирован добавлением молекул-зондов для накопления в опухолях и использования в диагностике *in vivo*.

Список литературы

Goldstein D.J., Horobin R.W. Rate factors in staining with alcian blue // *Histochemical Journal*. 1974. V. 6. P. 157–174.

Johnson I.M., Kumar S.G.B., Malathi R. De-intercalation of Ethidium Bromide and Acridine Orange by Xanthine derivatives and their modulatory effect on anticancer agents: a study of DNA-directed toxicity enlightened by time correlated single photon counting // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2003. V. 20. № 5. P. 677–685.

Horobin R.W. Histochemistry: an explanatory outline of histochemistry and biophysical staining // Stuttgart: Fisher, 1982. 310 p.

Kenneth H. J., James A. S. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate - propidium iodide // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985. V. 33. № 1. P. 77–79.

Khlebtsov B. In: Int. Workshops on “Nanoparticles, nanostructured objects: preparation and applications”, Saratov, April 4 and June 9, 2014; Report on a Megagrant no. 14.Z50.31.0004 from the Government of the Russian Federation (Saratov State University, June 31, 2014).

Khlebtsov B.N., Panfilova E.V., Terentyuk G.S., Maksimova I.L., Ivanov A.V., Khlebtsov N.G. Plasmonic nanopowders for photothermal therapy of tumors // *Langmuir*. 2012. V. 28. P. 8894–9002.

Valeur B. Molecular fluorescence: principles and applications // Wiley-VCH: Weinheim, 2001. 399 p.

Zhang P., Yang X.X., Wang Y., Zhao N.W., Xiong Z.H., Huang C.Z. Rapid synthesis of highly luminescent and stable Au₂₀ nanoclusters for active tumor-targeted imaging *in vitro* and *in vivo* // *Nanoscale*. 2014. V. 6. № 4. P. 2261–2269.

УДК 576.535:576.385:576.31:612.086:547.972:582.951.6

ДИНАМИКА ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПОЧКИ ЭМБРИОНА СВИНЬИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЛАВАНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА

**Н.А. Наволокин¹, А.В. Полуконова², Н.В. Полуконова¹,
А.Б. Бучарская¹, Г.Н. Маслякова¹**

¹ ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения РФ
410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 11. E-mail: navolokin1@rambler.ru

² ГБОУ ВПО Саратовский государственный
университет им. Н.Г. Чернышевского Министерства образования РФ
410012 г. Саратов, ул. Астраханская, 83. E-mail: annypol@rambler.ru

Представлена динамика цитоморфологических изменений в культуре клеток почки эмбриона свиньи (SPEV-2), при разных концентрациях раствора сухого спиртового экстракта аврана лекарственного. Установлено статистически достоверное дозозависимое увеличение степени поврежденности ДНК в клетках, зараженных онковирусом, под действием экстракта аврана. Выявлены признаки, маркирующие как процесс гибели клеток, так и стадии цитотоксичности экстракта, индуцирующего ДНК-повреждения в клетках, зараженных онковирусом, в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: экстракт аврана лекарственного, пропидий йодистый, клетки почек эмбрионов свиньи (SPEV-2), апоптоз

The cytotoxic activity of the solution dry alcoholic extract of the medicinal *Hyssopus officinalis* (*Gratiola officinalis* L.) was investigated in vitro experiments on embryonic kidney cells pig (SPEV-2). Concentration studied: 3.2 µg/ml, 32 µg/mL, 320 µg/ml, 3.2 mg/ml, 32 mg/ml. Minimum concentration of the extract solution, significantly inhibits the growth of cells in culture, is a 32 µg / ml. Most cytostatic activity of the extract solution set for the concentration of 3.2 mg / ml, which leads to almost complete destruction of the cells in culture.

Keywords: *Gratiola officinalis* L., propidium iodide, the cells of pig embryonic kidney (SPEV-2), apoptosis.

Введение

Культура клеток почки эмбриона свиньи, зараженных онковирусом (SPEV-2), служит моделью опухолевых клеток (Бибикова, Староверов, 2011). Полученный нами раствор сухого спиртового экстракта аврана

лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), наряду со слабой токсичностью, обладает выраженной противоопухолевой активностью, в отношении перевиваемого рака печени крыс PC-1, а также выраженным антиканцерогенным действием (Полуконова и др., 2011, 2013; Navolokin et al., 2012; Наволокин, Павлова, 2012; Наволокин и др., 2013; Курчатова и др., 2014). Химический состав этого экстракта, установленный на газовом хромато-масс-спектрометре Finnigan, показал наличие в нем биофлавоноида кверцетина, а также: 4-винил-2-метоксифенола, 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-она, 2,3-дигидробензофурана, 3-фуранкарбоновой кислоты, 5-гидроксиметил-2-фуральдегида, этил- α -D-рибозид, 4-пропилфенола, пирокатехина, L-луксозы (пентозы), 6-деоксигексозы L-галактозы, этилового эфира бензоиллуксусной кислоты, пальмитиновой кислоты, гомованилиновой кислоты, глюкозы, 1,4-ангидро-D-маннитола, бензойной кислоты.

Цель работы – описать динамику цитоморфологических изменений, происходящих в культуре клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2), зараженных онковирусом, с увеличением концентрации раствора сухого спиртового экстракта аврана лекарственного.

Материал и методика

Использована культура клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом (SPEV-2). Культивирование проводили в пластиковых флаконах в среде RPMI 4 на базе лаборатории ИБФРМ РАН (Саратов). Было заложено шесть лунок круглодонного планшета с культурой клеток – одна контрольная и пять экспериментальных. Контролем служили клетки в питательной среде без добавления экстракта аврана лекарственного, выросших в течение суток. В пять лунок вносили экстрактивные вещества, предварительно растворенные в той же питательной среде. Анализировались концентрации раствора экстракта: 3.2 мкг/мл; 32 мкг/мл; 320 мкг/мл; 3.2 мг/мл и 32 мг/мл. Клетки культивировались в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 часов, после чего окрашивались. В качестве красителя использован йодистый пропидий, как интеркалирующий в ДНК ядра и не проникающий через неповрежденные клеточные мембраны (Фрешни, 2011). Для визуализации клеток использовали комбинирование нескольких микроскопических режимов регистрации светорассеяния и флюоресценции на световом микроскопе LeicaDM 2500 с галогеновым осветителем Leica CLS 150. Анализировались показатели: среднее число мертвых клеток, окрашенных пропидием в оранжевый цвет, среднее общее количество клеток в культуре, отношение числа мертвых клеток к общему количеству клеток в культуре, умноженное на 100%, а также отмечали возникновение характерной внутриклеточной грануляции и интенсивность свечения красителя.

Для статистической обработки использовали программу SPSS 13.0 общепринятыми методами медико-биологической статистики с вычислением среднего и стандартной ошибки среднего, значимость различий при нормальном распределении определяли при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение

В контроле клетки полигональной, треугольной, реже, округлой формы лежали ровным монослоем, плотно прилегая как друг к другу, так и к подложке. Цитоплазма гомогенная, ядро четко оформлено. Число мертвых клеток единично (табл. 1).

При концентрации раствора аврана 3.2 мкг/мл число клеток, не прикрепленных к подложке, незначительно увеличивалось. Среднее число клеток в поле зрения ниже, чем в контроле, достоверного отличия по среднему числу мертвых клеток в поле зрения не выявлено (табл. 1). Свечение ДНК мертвых клеток интенсивное, четко очерчено. Окрашивание среды и самих клеток произошло за счет окрашивания раствором экстракта. При сопоставлении фотоснимков, полученных при разных микроскопических режимах регистрации светорассеяния и флюоресценции, нами не выявлено морфологических отличий живых и погибших клеток.

При концентрации раствора аврана 32 мкг/мл наблюдали резкое преобладание клеток округлой формы, клетки лежали менее организованно и не были прикреплены к подложке. Отмечали появление выраженной внутриклеточной грануляции, неровные контуры клеточной мембраны. Среднее число клеток в поле зрения достоверно ниже; среднее число мертвых клеток в поле зрения достоверно больше, чем в контроле (табл. 1). Свечение ДНК погибших клеток интенсивнее, а вокруг зоны свечения появились ореолы. Интенсивность окрашивания среды и клеток возросла с увеличением концентрации раствора аврана.

При концентрации раствора аврана 320 мкг/мл отмечали увеличение разрозненности клеток, они не были прикреплены к подложке и, в большинстве случаев, имели округлую форму. Свечение ДНК погибших клеток интенсивное, заметный ореол вокруг зоны свечения в ряде случаев был не симметричен. При сопоставлении фотоснимков, полученных нами при разных микроскопических режимах светорассеяния и флюоресценции, выявили следующие морфологические отличия погибших клеток от живых: цитоплазма этих клеток была с умеренно выраженной внутриклеточной грануляцией, их ядра не дифференцировались, у некоторых было фрагментировано ядро, что служит неспецифическим признаком начала гибели клетки. Среднее число мертвых клеток в поле зрения было достоверно больше, чем в контроле (табл. 1). При увеличении концентрации в 10 раз (от 32 мкг/мл к 320

мкг/мл) при линейной зависимости отмечалось уменьшение числа выросших клеток в поле зрения, однако в эксперименте происходило увеличение среднего числа выросших клеток в поле зрения, что не являлось линейной зависимостью.

При концентрации раствора аврана 3.2 мг/мл мы наблюдали, что клетки приобретали характерную звездчатую форму или сохраняли округлую, с фрагментацией клеточной мембраны и вытеканием содержимого, погибшие клетки образовывали конгломераты, также отмечались клетки по типу теней – апоптотические клетки. Число мертвых клеток практически идентично общему числу клеток, что свидетельствовало о том, что все видимые клетки были погибшими. Мы отмечали у них резко выраженную внутриклеточную грануляцию и появление черных округлых образований в цитоплазме, что может характеризовать продолжающийся апоптоз. Среднее число выросших клеток в поле зрения было меньше; среднее число мертвых клеток в поле зрения больше, как в контроле, так и по сравнению с предыдущей концентрацией раствора (табл. 1). Интенсивность свечения ДНК погибших клеток достаточно сильная, что свидетельствовало об их гибели непосредственно в ходе эксперимента под действием экстракта в течение суток. Зона свечения и ореолы не имели четких границ.

При концентрации раствора 32 мг/мл мы отмечали, что клетки также имели звездчатую или, реже, сохраняли округлую форму, клетки находились в состоянии набухания; погибшие клетки образовывали конгломераты, конгломерация более выражена по сравнению с предыдущей концентрацией. Отмечали высокую степень внутриклеточной грануляции, фрагментацию клеточной мембраны с вытеканием содержимого, ядра клеток не дифференцировались. Среднее число клеток в поле зрения меньше, чем в контроле; среднее число мертвых клеток в поле зрения совпадало с общим числом клеток в поле зрения (табл. 1). Интенсивность свечения ДНК погибших клеток была намного ниже, чем при предыдущей концентрации, что свидетельствовало об их гибели под действием экстракта уже в первые часы от начала эксперимента. Слабое свечение также показывало разрушение ДНК ядра, что отражало заключительные стадии гибели клетки.

Таблица 1. Изменение числа клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2) в контроле и в культуре с добавлением раствора экстракта аврана при разных концентрациях. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Показатель	контроль	Концентрации раствора экстракта аврана				
		3.2 мкг/мл	32 мкг/мл	320 мкг/мл	3.2 мг/мл	32 мг/мл
Среднее число мертвых клеток	8.33±0.44	6.16±0.53	9.5±0.75 p<0.001	17±0.42 p<0.05	304.66±17.34 p<0.001	316.2±3.58 p<0.001
Среднее общее число клеток	562.66±16.02	446.5±12.32 p<0.05	392.5±23.16 p<0.001	427±20.28 p<0.001	301.33±18.05 p<0.001	316.2±3.58
Отношение числа мертвых клеток к общему числу клеток, в процентах	1.47±0.06	1.39±0.14 p<0.01	3.13±0.29 p<0.001	4.03±0.13 p<0.01	100±0 p<0.001	100±0 p<0.001

Выводы

На примере действия раствора экстракта аврана с установленной ранее противоопухолевой активностью (Наволокин и др., 2013) нами определены стадии ДНК-повреждения в клетках, зараженных онковирусом, в условиях *in vitro*. Установлены цитоморфологические признаки, маркирующие процесс гибели клеток: наличие черных образований в цитоплазме, нечеткие контуры самих клеток и приобретение ими звездчатой формы, а также, на заключительных его этапах, набухание клетки, фрагментация клеточной мембраны с вытеканием содержимого, образование погибшими клетками конгломератов и снижение интенсивности свечения йодистого пропидия, свидетельствующее о распаде ДНК ядра. Интенсивность свечения красителя свидетельствует, с одной стороны, о целостности ДНК ядра, а с другой – о времени гибели клетки. Так, при разрушенной ДНК в погибшей клетке свечение будет неярким.

Список литературы

Бибикова О.А., Староверов С.А., Соколов О.И., Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Плазмонно-резонансные золотые частицы как носители лекарственных веществ и оптические метки в цитологических исследованиях // Известия Саратовского университета. Серия Физика. 2011. Т. 11. Вып. 2. С. 58–61.

Наволокин Н.А., Павлова А.В. Морфологические изменения в мышцах у лабораторных крыс и определение токсичности при введении экстракта аврана // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2012. Т. 2. Вып. 2. С. 82–83.

Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б., Дурнова Н. А. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени Рс-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9. № 2. С. 213–220.

Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with trasplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. V. 1. № 2. 0203.

Курчатова М. Н., Дурнова Н. А., Полуконова Н. В. Влияние экстрактов, содержащих биофлавоноиды, на индукцию микроядер диоксидином в эритроцитах крови беспородных белых мышей // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. № 2. С. 58–65.

Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Дурнова Н.А. Патент Российская Федерация. 2482863. Способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). 2013.

Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной

композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiolaofficinalis*L.) // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165–173.

Полуконова Н.В., Меркулова Е.П., Дурнова Н.А., Романтеева Ю.В., Бородулин В.Г. Изучение антиоксидантной активности экстракта аврана лекарственного на крысах с перевитой опухолью печени РС-1 // Тезисы докладов научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, Крым, Украина 23 – 28 мая 2011 г. Киев, 2011. С. 585.

Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. Пер. с англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 691 с.

Научное издание

**«ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭКОСИСТЕМ
И ЗАЩИТЫ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА»**

МАТЕРИАЛЫ

VII Научно-практической школы
для молодых учёных, аспирантов и студентов
по проблемам молекулярной экологии и эволюции

Борок, 16 – 26 октября 2014 г.

Общество с ограниченной ответственностью
«Костромской печатный дом»
156005 г. Кострома, ул. Мясницкая, 43 а