

ВЫЯСНЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ФУНГИЦИДОВ НА МИКРОМИЦЕТЫ МЕТОДОМ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭКВОРИНА

Черемных А.В., Козлова О.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г

Казанский Государственный университет, Казань, Республика Татарстан, Россия,
Alexei.Kolpakov@ksu.ru

В концепции о значении вторичных посредников в регуляции клеточного метаболизма особое место отводится универсальной роли кальция, функции которого в качестве мессенджера заключаются в формировании ответа клетки на внешние воздействия. В настоящее время большое внимание уделяется изучению влияния на микроорганизмы мембраноактивных противогрибковых препаратов (фунгициды) микробного происхождения, которые даже в очень низких концентрациях способны вызывать изменения содержания кальция в цитозоле. Несмотря на достаточный объем методических разработок в изучении механизмов, контролирующих уровень кальция в клетке, в этой проблеме остается много неясного. Качественный скачок в исследованиях кальциевого обмена обеспечивается использованием метода рекомбинантного экворина, который распадается на апоэкворин и селентрамид с выделением энергии в голубой части спектра, а интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Идея использования метода рекомбинантного экворина, позволяющего контролировать повышение или понижение пула кальция в клетках растущей культуры микромицетов, может найти успешное применение для выяснения механизма действия фунгицидов на рост колоний микромицетов, ветвление гифов и жизнеспособность клетки, что составляет цель настоящей работы.

Объектом изучения эффектов фунгицидов был штамм *Aspergillus awamori* 66A, полученный из лаборатории исследования клеток микромицетов Эдинбургского университета. Штамм *A.awamori* 66A представляет собой мутант, в котором экспрессирован фотобелок экворин

Исследуемые фунгициды были представлены пермеабилизирующими противогрибковыми препаратами (Тензин, Грамицидин, АмфотерицинБ, Сурфактин, Вискозинамид), нерастворимыми в воде, кроме Амфотерицина Б. Основные растворы готовили либо в метаноле $\text{Me}(\text{OH})$, либо диметилсульфоксиде (ДМСО), контролями были растворители препаратов, добавляемые в среду роста.

Культуру *A.awamori* 66A выращивали в жидкой среде Вогеля при температуре 30°C в 96-клеточной матрице. В каждую ячейку матричной планки вносили 100 мкл суспензии спор с начальной концентрацией 5×10^5 в 1мл. После достижения определенной фазы роста культуру инкубировали в течение 4 ч с селентразином для восстановления экворина, после чего в каждую ячейку вносили растворы испытываемых препаратов и измеряли эмиссию света с помощью люминометра, выражая ее в относительных световых единицах. При этом эмиссия света очень невелика по интенсивности, в связи с чем для измерения использовали специальный люминометр (*EG & G Berthold LB 96 P Microlumat*), оснащенный фотоумножителем.

В предварительных экспериментах было показано, что оба растворителя фунгицидов- $\text{Me}(\text{OH})$ и ДМСО в концентрациях, не превышающих 5%, не изменяли интенсивность свечения и были использованы в этих пределах при постановке экспериментов. Изучение влияния вышеуказанных препаратов выявило способность их даже в очень низких концентрациях индуцировать увеличение содержания

внутриклеточного Ca^{2+} . Нами проведен анализ изменения трех параметров кальциевых всплесков (амплитуда всплески, ее продолжительность и конечный уровень кальция).

Данные экспериментов показали, что эффект пермеабилизирующих веществ на концентрацию кальция в большой степени зависит от источника их получения, дозы и механизма действия на клеточную оболочку. Так, Тензин, который продуцируется в очень низких концентрациях клетками *Pseudomonas spp*, эффективно повышает уровень кальция в цитозоле лишь в больших дозах (>80 мкМ). Это означает, что изменения в содержании внутриклеточного кальция, которые наблюдались в ходе экспериментов, не всегда могут иметь место в природе, а противогрибковое действие тензина либо не направлено на нарушение кальциевого баланса в клетке, либо микромикет *A.awamori* является нечувствительным к данному препарату.

Вискозинамид, напротив, вырабатывается в природе (клетками *P.fluorescens*) в больших количествах, но для повышения уровня кальция требуется его в значительно меньших концентрациях (>5 мкМ), чем Тензина. В связи с этим можно ожидать, что изменения в содержании кальция, наблюдаемые в ходе экспериментов, могут иметь место у почвенных микромицетов в природных условиях, благодаря чему ингибируется их рост.

Что касается других пермеабилизирующих препаратов микробного происхождения - Амфотерицина Б (*Streptomyces spp.*), Сурфактина (*B.subtilis*) и Грамицидина (*B.brevis*), то они повышали уровень кальция в цитозоле более, чем на $0,9$ мМ, который оставался высоким даже через час после введения низких концентраций препарата (от 2 до 20 мкМ). Исходя из этого можно заключить, что клетки микромицета, вследствие резко повышающейся проницаемости плазматической мембраны в присутствии исследуемых препаратов, не справлялись с функцией снижения уровня кальция до исходного.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение, что фунгициды Амфотерицин Б, Сурфактин и Грамицидин вызывали значительное как по величине, так и продолжительности повышение содержания кальция в цитозоле. Когда колонии микромицета подвергались воздействию данных препаратов в высоких концентрациях, исходный уровень внутриклеточного кальция в гифах не восстанавливался, что свидетельствует о нарушении гомеостаза Ca^{2+} и, возможно, других ионов. Исследуя Тензин и Вискозинамид как фунгициды ингибирующего действия установили, что только последний повышает уровень Ca^{2+} в цитозоле при использовании его в концентрациях, близких к тем, в которых он может присутствовать в почве и, следовательно, препятствует росту почвенных микромицетов, нарушая гомеостаз Ca^{2+} .