

КЛЕТОЧНЫЙ И КАЛЬЦИЕВЫЙ ОТВЕТЫ *ASPERGILLUS AWAMORI* НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АМФОТЕРИЦИНОМ

© 2014 г. А. А. Абдельрахман*, О. В. Козлова**, С. М. А. Эльшафей*,
Ф. К. Алимова***, Ф. Г. Куприянова-Ашина***,¹

*Факультет сельского хозяйства, Университет Минья, г. Эль-Минья, Египет

** Эдинбургский университет, Великобритания

*** Казанский (Приволжский) федеральный университет

Поступила в редакцию 13.10.2013 г.

В экспериментах с мутантным штаммом *Aspergillus awamori* 66A, содержащим рекомбинантный Ca^{2+} -зависимый фоточувствительный белок экворин, изучены клеточный и Ca^{2+} -ответы на стрессорное воздействие пермеабилizующего фунгицида – амфотерицина В. Клеточный ответ, который фиксировали по изменениям роста и развития микромицета (инициации прорастания спор, роста мицелия, интенсивности спорообразования), был дозозависим. Амфотерицин в низких концентрациях (2.5 мкМ) стимулировал процессы прорастания спор: количество спор с ростковой трубкой увеличивалось в 2–3 раза по сравнению с контролем (среда без фунгицида). С увеличением концентрации фунгицида до 20 мкМ прорастание спор ингибировалось. Дозозависимый эффект амфотерицина был подтвержден по показателям разрастания мицелия и интенсивности спорообразования при культивировании микромицета на плотной среде Вогеля. Содержание внутриклеточного Ca^{2+} , которое регистрировали по интенсивности люминесценции экворина, также дозозависимо изменялось при воздействии амфотерицина: при внесении в культуру высоких концентраций (10, 20 мкМ) фунгицида в клетках *A. awamori* обнаруживалось резкое повышение уровня Ca^{2+} (кальциевые вспышки). Повышенный уровень внутриклеточного Ca^{2+} при воздействии высоких доз амфотерицина не снижался до исходного на протяжении всего эксперимента (360 с), что коррелировало с угнетением роста и развития гриба. Обсуждается возможность использования штамма *A. awamori* с рекомбинантным экворинном в качестве тестерного организма для отбора соединений с фунгицидной активностью.

Ключевые слова: *Aspergillus awamori*, рекомбинантный экворин, пермеабилizующий фунгицид амфотерицин В, клеточный ответ, рост мицелия, спорообразование, Ca^{2+} -ответ, динамика Ca^{2+} .

DOI: 10.7868/S0026365614040028

Одним из важных направлений защиты растений от фитопатогенной микрофлоры, в том числе от фитопатогенных микромицетов, является поиск соединений с фунгицидной активностью. Хорошие результаты дает обработка семян ячменя препаратами микробного происхождения, которые обеспечивают снижение количества плесневых грибов [1]. Вместе с тем частота встречаемости микромицетов рода *Aspergillus*, потенциально патогенных для человека, остается высокой [2]. Токсичность грибов рода *Aspergillus* и их выраженная устойчивость к различным фунгицидам обуславливают поиск новых биологически активных веществ, среди которых перспективным оказался амфотерицин В, активный в отношении многих фитопатогенных грибов, возбудителей различных заболеваний, в том числе не поддающихся

лечению другими противогрибковыми препаратами [3–5].

Как представитель полиеновых антибиотиков амфотерицин обладает способностью увеличивать проницаемость мембран для ионов [6, 7], в том числе и для ионов кальция, который имеет сигнальные функции для контроля целого ряда процессов, происходящих в эукариотической клетке. Сигнальные функции кальция хорошо изучены у животных и растительных организмов [8, 9]. Для мицелиальных грибов известны сигнальные функции Ca^{2+} в развитии апоптозной реакции [10, 11]. Однако в современной физиологии остается много неясного в вопросах кальциевой сигнализации при стрессорных воздействиях, когда нарушения кальциевого гомеостаза будут влиять на функционирование Ca^{2+} -сигнальных систем, физиологические процессы и сохранение жизнеспособности клеток. При нарушении каль-

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: flera.ashina@kpfu.ru).

циевого гомеостаза события в клетке могут протекать по разным сценариям, с одной стороны, обуславливая вызванный разрегулированностью кальция процесс токсичности, с другой – включение путей репарации повреждений, где Ca^{2+} играет определяющую роль как посредник в трансдукции сигнальных каскадов [12]. Реализация определенной программы будет зависеть от степени нарушения Ca^{2+} -гомеостаза в клетке при воздействии конкретных физиологических стимулов. Для определения возможных сценариев стрессового ответа, в том числе результативность применения фунгицида, необходимо иметь тест-систему, которая позволила бы анализировать зависимость изменения процессов роста и развития микромицета от уровня внутриклеточного кальция.

Целью работы было оценить взаимосвязь между ростом и развитием мутантного штамма *Aspergillus awamori*, содержащего рекомбинантный белок экворин, и изменением содержания ионов Ca^{2+} в цитозоле гриба, вызванным воздействием на микромицет пермеабиллизующего фунгицида – амфотерицина В.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования был мутантный штамм *Aspergillus awamori* 66А, экспрессирующий фотозависимый белок экворин (штамм любезно предоставлен лабораторией исследования клеток микромицетов Эдинбургского университета) [13].

Штамм *A. awamori* 66А культивировали при 30°C в жидкой среде Вогеля с добавлением сахаразы (среда ВС) и на плотной среде (2% агара) того же состава, обогащенной глюкозой (среда ОСГ) [14]. Эксперименты проводили на моноспоровой культуре *A. awamori* 66А, для получения которой готовили конидиальную суспензию гриба с титром 20–30 спор/мл. На поверхности жидкой среды Вогеля гриб рос в виде отдельных микроколоний, которые через 24 ч инкубации переносили на плотную среду Вогеля. После 7 сут выращивания поверхностной культуры споры смывали 0.8% раствором NaCl (PZ), отмывали от среды и остатков мицелия (центрифугирование, 3000 g, 15 мин), ресуспендировали в растворе (PZ) и хранили при 4°C. Концентрацию спор определяли подсчетом в камере Горяева. Плотность суспензии спор, используемой в опытах, составляла 3×10^5 спор/мл.

В качестве стрессорного фактора использовали фунгицид, амфотерицин В (“Sigma”) – полиеновый антибиотик, синтезируемый актиномицетами рода *Streptomyces*, для которого известны синонимы: Amfostat, Amphotericin В, Fungilin, Fundizone и др. [3]. Влияние амфотерицина на развитие *A. awamori* определяли при его внесении в культуры микромицета разных фаз роста.

О влиянии амфотерицина на процессы прорастания спор судили по скорости их набухания и количеству спор с ростковой трубкой. При подборе концентраций амфотерицина учитывали, что высокие дозы антибиотика оказывают фунгицидное действие на микромицет, а средние дозы – статический эффект, когда блокируются функции размножения при сохранении жизнеспособности клеток. При изучении фунгицидного действия амфотерицин использовали в диапазоне концентраций: 2.5, 10 и 20 мкМ. Набухание спор анализировали в капле жидкой среды Вогеля (10 мкл) на стекле при концентрации 3×10^5 спор/мл и содержании амфотерицина в каждой пробе от 2.5 до 20 мкМ. Во избежание высыхания среды стекла со спорами помещали во влажную камеру (100% влажности) и выдерживали при 30°C в течение 6 ч. В опытном и контрольном (среда без фунгицида) вариантах через каждые 2 ч с помощью окуляро-микроскопа измеряли диаметр спор (d , мкм) (микроскоп Zeiss, Axio Imager 2).

Прорастание спор исследовали при их инкубации (30°C) в жидкой среде Вогеля в пробирках при концентрации спор 3×10^5 /мл и содержании амфотерицина 2.5, 10, 20 мкМ. В течение 24 ч инкубации регистрировали количество спор с проростковой трубкой (начало лаг-фазы) и определяли ветвление ростковой трубки (начало экспоненциальной фазы). Количество спор с ростковой трубкой и ответвления гиф от главной проростковой трубки подсчитывали в камере Горяева в 20 полях зрения.

О действии фунгицида на качество погруженной культуры *A. awamori*, используемой как посевной материал, судили по степени разрастания мицелия на плотной среде Вогеля (радиус колонии, мм). Для этого споры (3×10^5 спор/мл) засеивали в жидкую среду Вогеля и инкубировали в течение 24 ч (начало фазы экспоненциального роста). В выросшую культуру *A. awamori* добавляли амфотерицин в разных концентрациях (2.5, 10, 20 мкМ) и продолжали инкубирование в течение 24 ч, после чего аликвоты выросшей культуры (0.1 мкл) высевали на агаризованную среду и выращивали при 30°C в течение 7 сут. Радиус колоний микромицета измеряли через каждые 24 ч и высчитывали общую и удельную скорости роста гриба по методу [15].

Влияние амфотерицина на спорообразование *A. awamori* изучали в условиях эксперимента, описанных выше. Суточную культуру *A. awamori*, выросшую в пробирках со средой Вогеля, содержащей амфотерицин (2.5, 10, 20 мкМ), высевали (0.1 мкл) на плотную среду Вогеля. Через каждые 24 ч в течение 7 сут роста гриба вдоль линии окружности колонии лабораторным сверлом вырезали блоки агаровой культуры, которые помещали в жидкую среду и для освобождения спор встряхивали (15 мин) на качалке (200 об/мин). Количество спор в расчете на 1 мл взвеси подсчитывали в камере Горяева.

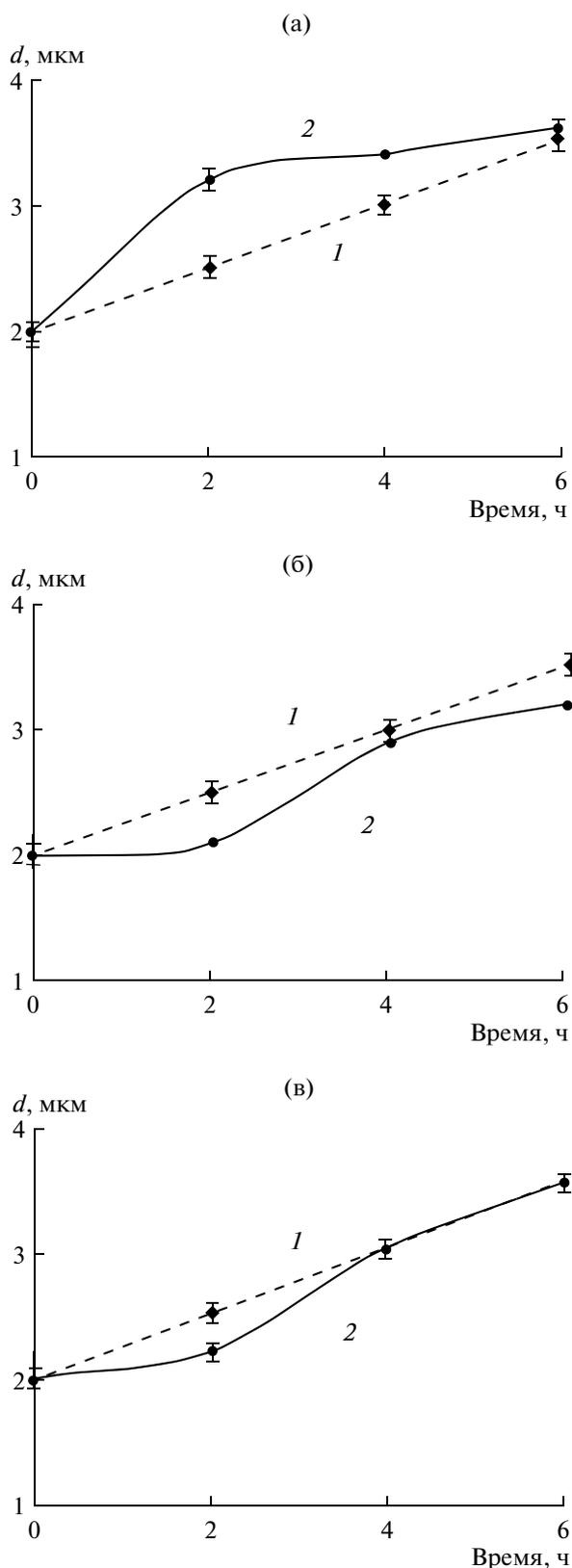


Рис. 1. Динамика набухания спор *A. awamori* (d , μm) при инкубации в среде Вогеля, содержащей амфотерицин: 1 – среда без фунгицида; 2 – варианты опыта с фунгицидом в дозах: а – 2.5, б – 10, в – 20 μM соответственно.

Влияние амфотерицина на содержание кальция в цитозоле *A. awamori* определяли по люминесценции рекомбинантного экворина [16]. Люминесценцию экворина измеряли в клетках культуры, которую выращивали в жидкой среде Вогеля в 96-клеточном планшете как описано ранее [17]. В каждую ячейку планшета вносили 100 $\mu\text{л}$ суспензии спор с начальной концентрацией 5×10^5 клеток/мл и инкубировали при 30°C в течение 24 ч до достижения начала фазы экспоненциального роста. Затем в культуры *A. awamori* вносили селентразин и инкубировали в течение 4 ч для восстановления экворина. После этого в каждую ячейку с культурой вносили амфотерицин в концентрациях: 2.5, 10, 20 μM (в контрольные образцы вносили в тех же объемах воду), и измеряли люминесценцию в течение 10 мин с помощью люминометра, выражая ее в относительных световых единицах (ОСЕ). Поскольку эмиссия света очень невелика, для ее измерения использовали специальный люминометр (EG & G Berthold LB 96 P Microlummat), оснащенный фотоумножителем.

Полученные результаты обрабатывали методом вариационно-статистического анализа, принимая критерием достоверности $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании влияния амфотерицина на прорастание спор и рост культуры *A. awamori* их оптимальная концентрация в экспериментах составляла 3×10^5 спор/мл жидкой среды Вогеля. Использование суспензии спор более высокой плотности затрудняло проведение экспериментов вследствие агломерации спор и образования переплетения гиф при их прорастании.

О влиянии амфотерицина на прорастание спор *A. awamori* судили по изменению их объема при набухании вследствие метаболизации эндогенных и экзогенных субстратов на начальном этапе развития гриба. Было обнаружено, что амфотерицин в концентрациях 10 и 20 μM подавлял набухание спор в течение 2 ч инкубации, однако к концу наблюдений (6 ч) эффект ингибиции нивелировался (рис. 1б, 1в). Напротив, в низких концентрациях (2.5 μM) амфотерицин активировал процессы набухания спор, через 2 ч инкубации диаметр спор увеличивался на 28% в сравнении с контролем, но к концу эксперимента этот эффект исчезал (рис. 1а). Следует отметить, что относительно низких концентраций антибиотиков (1/5–1/10 бактерицидной дозы) имеются данные об их ростстимулирующем действии на клетку. Например, стрептомицин в концентрации 100 $\mu\text{г}/\text{мл}$ стимулировал, а в дозах от 500 до 1000 $\mu\text{г}/\text{мл}$ подавлял рост *Streptomyces griseus* [18]. Микроскопический анализ прорастания спор *A. awamori* через 12 ч их инкубации в жидкой среде Вогеля показал в контрольных вариантах появление у некоторых

спор проростковой трубки. В опытных вариантах фунгицид в количестве 20 мкМ недостоверно угнетал образование ростковых трубок, тогда как при снижении его концентрации (<10 мкМ) дозозависимо стимулировал прорастание спор (рис. 2). Отметим, что на этапе прорастания спор *A. awamori* ингибиторное действие амфотерицина обнаруживалось в меньшей степени, чем на этапе набухания спор.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние амфотерицина на развитие микромицета, внося фунгицид в культуру начала фазы экспоненциального роста (24 ч) в концентрациях: 20, 10, 2.5 мкМ, и продолжая их инкубацию. Через 6, 12, 18, 24 ч подсчитывали число боковых гиф, образующихся от главной проростковой трубки. Как в контроле, так и в опытах число спор с ответвлениями от ростковой трубки возрастало с увеличением времени инкубации. При этом амфотерицин в низких концентрациях (2.5 мкМ) стимулировал образование боковых гиф, тогда как в концентрациях 10 и 20 мкМ ингибировал их ветвление (табл. 1).

Так как на развитие микробных культур большое влияние оказывает качество посевного материала, в следующей серии экспериментов в качестве инокулята были использованы культуры *A. awamori*, выросшие в присутствии различных доз фунгицида. При постановке экспериментов в культуру, выращенную в течение 24 ч в жидкой среде, добавляли антибиотик (2.5, 10 и 20 мкМ), инкубировали еще 24 ч и затем аликвоты высевали на агаризованную среду Вогеля и инкубировали в течение 7 сут. О влиянии фунгицида на качество посевного материала судили по изменению размера растущих колоний микромицета (*d*, мкм), рассчитывая скорость разрастания мицелия *A. awamori*. Оказалось, что размер колоний в вариантах дей-

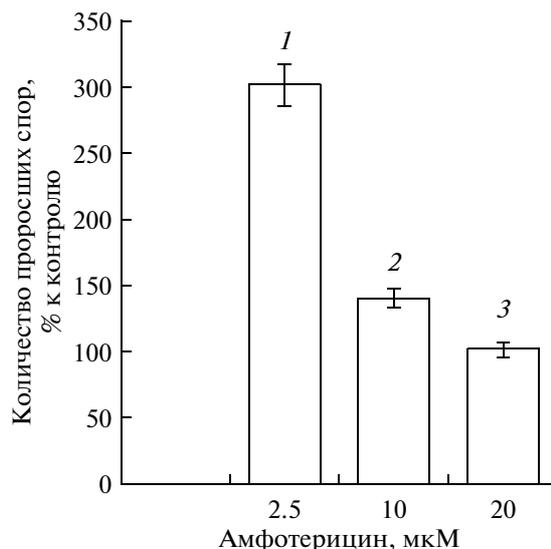


Рис. 2. Динамика прорастания спор в жидкой среде Вогеля, содержащей амфотерицин: 100% – количество проросших спор в контроле (среда без фунгицида) 1, 2, 3 – количество спор с ростковой трубкой через 24 ч инкубации в среде с амфотерицином в дозах 2.5, 10, 20 мкМ соответственно.

ствия фунгицида в дозе 2.5 мкМ превышал диаметр колоний в контрольных вариантах. При действии амфотерицина в концентрациях 10 и 20 мкМ колонии были меньшего размера, чем в контроле (рис. 3). Эффект стимулирующей дозы (2.5 мкМ) фунгицида (превышение контрольного уровня на 60–40%) был наиболее выражен на протяжении первых суток роста культуры, и хотя через 48 ч он снижался, но превышал контрольный уровень в течение всего периода наблюдений. Это коррелирует с возрастанием удельной скорости роста культуры *A. awamori* (рис. 4б) до максимальных

Таблица 1. Динамика ветвления гиф в микроколониях *A. awamori* после воздействия амфотерицина на 24-часовую культуру

Время действия фунгицида, ч	Число гиф в микроколонии							
	Контроль*		Опыт, среда с фунгицидом					
	Число гиф	% к контролю	2.5 мкМ		10 мкМ		20 мкМ	
Число гиф			% к контролю	Число гиф	% к контролю	Число гиф	% к контролю	
0	1.13 ± 0.05	100	1.15 ± 0.06	101.76	1.16 ± 0.07	102.65	1.16 ± 0.07	102.65
6	3.50 ± 0.50	100	5.10 ± 0.50	145.71	3.60 ± 0.50	102.85	3.10 ± 0.50	88.57
12	4.60 ± 0.80	100	6.40 ± 0.70	139.13	4.70 ± 0.30	102.17	3.40 ± 0.70	73.91
18	5.90 ± 1.00	100	7.60 ± 1.20	128.81	4.90 ± 0.40	83.05	3.90 ± 0.80	66.10
24	6.60 ± 1.20	100	8.90 ± 1.40	134.84	4.70 ± 0.20	71.21	2.90 ± 0.40	43.93

* Контролем служили клетки культуры, не подвергшиеся воздействию амфотерицина. Результаты представляют собой среднее ± стандартное отклонение, (n = 7) – число повторностей.

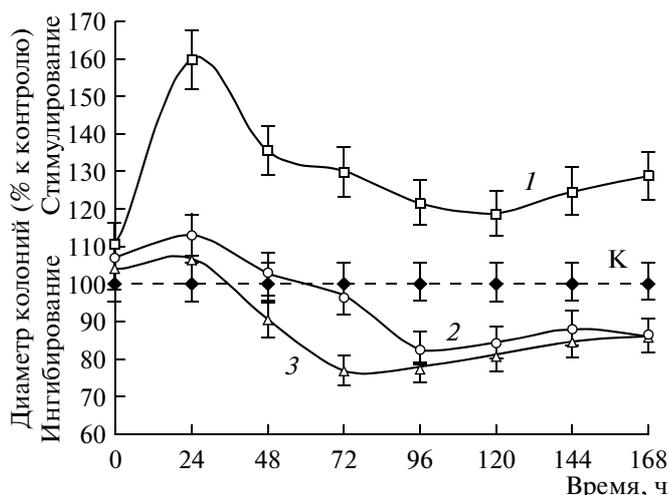


Рис. 3. Динамика роста колоний *A. awamori* на плотной среде при воздействии на посевной материал различных концентраций амфотерицина: К — диаметр колоний в контроле (среда без амфотерицина), принятый за 100%; 1, 2, 3, концентрации амфотерицина 2.5, 10, 20 мкМ соответственно.

значений через 24 ч после посева аликвот культур микромицета с амфотерицином (2.5 мкМ) на агаризованную среду, что характерно для экспоненциально растущей культуры. В вариантах опыта с концентрацией фунгицида 10 мкМ (рис. 4в) удельная скорость роста культуры также высока как в варианте с дозой 2.5 мкМ через 24 ч. При дальнейшем повышении концентрации антибиотика (20 мкМ) в культурах, используемых как инокулянт, наблюдали угнетение роста колоний и ингибирование удельной скорости их роста (рис. 4г).

Результаты изучения дозозависимого влияния амфотерицина на спорообразование *A. awamori*

(табл. 2) показали, что в динамике роста поверхностной культуры контрольного и опытных вариантов количество спор к концу 7 сут в культуре возрастало. Под действием больших доз амфотерицина (20 и 10 мкМ) спорообразование, начиная со вторых суток культивирования, подавлялось. Вместе с тем, этот процесс стимулировался при уменьшении дозы антибиотика до 2.5 мкМ.

Таким образом, исследование клеточного ответа на действие амфотерицина свидетельствует о дозозависимости эффектов фунгицида на всех стадиях развития культуры *A. awamori* (инициация прорастания спор, рост мицелия и интенсивность спорообразования).

На следующем этапе работы изучали влияние амфотерицина на формирование Ca^{2+} -ответа клеток микромицета, растущего в жидкой среде Вогеля в ячейках планшета. Измерение внутриклеточной концентрации кальция стало возможным благодаря использованию в работе мутантного штамма *A. awamori* 66А с рекомбинантным геном медузы *Aequorea victoria*, ответственным за синтез Ca^{2+} -зависимого флуоресцентного белка экворина (Мм = 21.400). Как известно [16], экворин состоит из одной полипептидной цепи, апоэкворина, гидрофобного люминофора, коэлюцентеразина и связанного кислорода. В результате присоединения ионов кальция к двум из трех кальций-связывающих сайтов в экворине, белок проявляет свойства оксигеназы, которая катализирует окисление коэлюцентеразина с помощью связанного кислорода. Это приводит к люминесценции экворина (излучению голубого света, $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}$), интенсивность которого зависит от концентрации свободных ионов кальция.

В экспериментах фунгицид в диапазоне концентраций от 2.0 до 20 мкМ вносили в 24-ч куль-

Таблица 2. Интенсивность спорообразования поверхностных культур *A. awamori*, предварительно инкубированных 24 ч в среде с амфотерицином в разных дозах

Возраст поверхностной культуры, сут	Количество спор в расчете на 1 мл взвеси $\times 10^8$			
	Концентрация фунгицида, мкМ			
	Контроль	2.50	10.00	20.00
0	3.00 \pm 0.50	3.30 \pm 0.06	3.20 \pm 0.07	3.10 \pm 0.07
1	3.20 \pm 0.10	5.10 \pm 0.50	3.60 \pm 0.50	3.40 \pm 0.50
2	4.00 \pm 0.20	5.40 \pm 0.70	4.10 \pm 0.30	3.60 \pm 0.70
3	5.10 \pm 0.80	6.60 \pm 1.00	4.90 \pm 0.40	3.90 \pm 0.80
4	5.70 \pm 0.20	6.90 \pm 0.40	4.70 \pm 0.20	4.40 \pm 0.40
5	6.10 \pm 0.80	7.20 \pm 0.20	5.10 \pm 0.07	4.90 \pm 0.40
6	6.30 \pm 0.50	7.80 \pm 0.30	5.50 \pm 0.10	5.30 \pm 0.20
7	6.56 \pm 0.70	8.39 \pm 0.10	5.60 \pm 0.08	5.60 \pm 0.10

** 0 — начальное время посева суспензии спор на плотную среду. Контроль — культура, не подвергнутая воздействию фунгицида. Результаты представляют собой среднее \pm стандартное отклонение, ($n = 6$) — число повторностей.

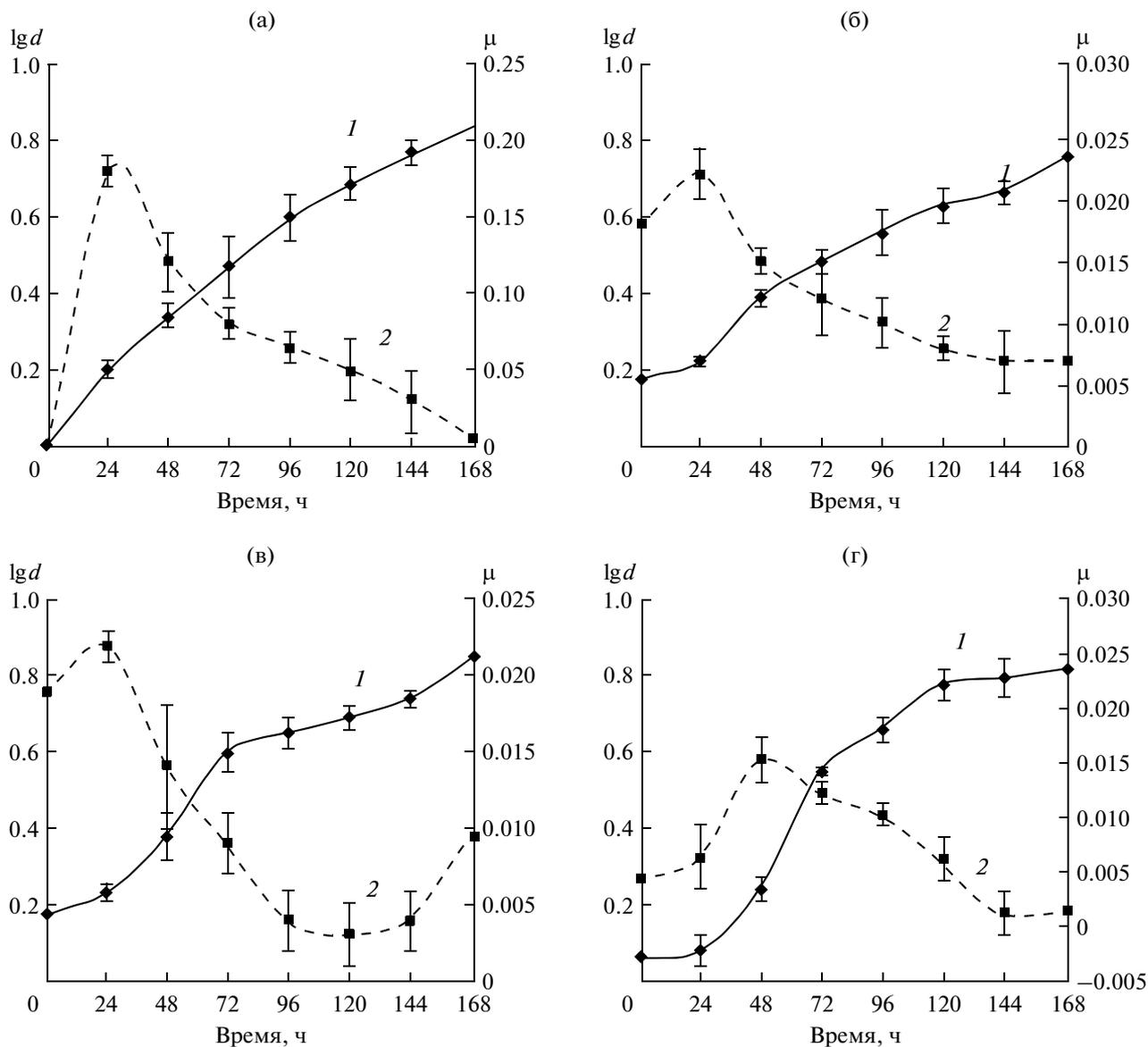


Рис. 4. Изменение удельной скорости роста (μ , ч^{-1}) культуры *A. awamori* в зависимости от концентрации амфотерицина (мкМ): а – (контроль) – среда без фунгицида; б – 2.5; в – 10; г – 20; 1 – ($\lg d$) диаметр колонии; 2 – удельная скорость роста культуры (μ , ч^{-1}).

туры *A. awamori*. Оказалось, что концентрация 2 мкМ является минимальной для достоверной индукции повышения содержания кальция в цитоплазме клеток аспергилла (рис. 5). С увеличением дозы пермебилизирующего фунгицида концентрация внутриклеточного кальция возрастала.

При исследовании влияния амфотерицина на кинетику формирования Ca^{2+} -ответа его концентрацию в клетках опытных и контрольных вариантов фиксировали в течение 6 мин. Измерения динамики Ca^{2+} показали скачкообразное возрастание его содержания уже через 1 мин после внесения амфотерицина в культуры опытных вари-

антов (рис. 6). Как интенсивность, так и скорость повышения Ca^{2+} в цитоплазме имели дозозависимый характер. При внесении амфотерицина в низкой концентрации (2.5 мкМ) Ca^{2+} -ответ формировался медленнее и был выражен значительно слабее, чем при воздействии больших доз фунгицида (10–20 мкМ). Дозозависимость действия амфотерицина фиксировалась в различиях: (1) времени увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле, (2) величины амплитуды подъема и (3) продолжительности удерживания повышенного уровня кальция в цитоплазме.

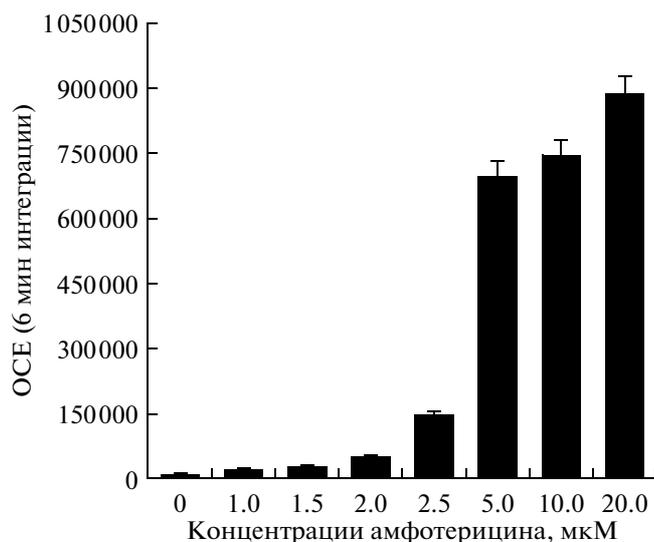


Рис. 5. Влияние амфотерицина на уровень цитозольного Ca^{2+} в показателях люминесценции экворина. Результаты представляют среднее \pm стандартная ошибка. OSE – относительные световые единицы.

ОБСУЖДЕНИЕ

У грибов транспорт Ca^{2+} обеспечивается системой, состоящей из ряда насосов и каналов, расположенных в плазматической мембране или мембранах клеточных органелл, являющихся хранилищами Ca^{2+} , которые могут поглощать и высвобождать ионы Ca^{2+} .

В изучении регуляции Ca^{2+} -сигнала в клетке большое внимание уделяется также роли митохондрий [19], в частности митохондриальных переносчиков, таких как кальциевый унипортер, обеспечивающий поглощение Ca^{2+} , и антипортеры, необходимые для выхода катионов. Для клеток дрожжей *Endomyces magnusii* было показано, что в митохондриях функционирует система медленного освобождения кальция [10]. Выход кальция происходит в отсутствие нарушений интактности внутренней митохондриальной мембраны (образования Ca^{2+} поры) и осуществляется электронейтральным $\text{Ca}^{2+} / 2\text{H}^{+}$ -обменником. Согласно данным авторов система транспорта кальция, включающая независимые пути его поглощения и выхода, принимает участие в регуляции уровня внутримитохондриального кальция и модуляции окислительного метаболизма в дрожжевой клетке, через Ca^{2+} -зависимую активацию НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы.

Ранее с использованием различных блокаторов Ca^{2+} -каналов и агонистов, специфически повышающих их активность, нами было установлено, что Ca^{2+} -вспышки в клетках *A. awamori*, возникающие при физико-химических воздействиях, регулируются поступлением Ca^{2+} как из среды, так и из

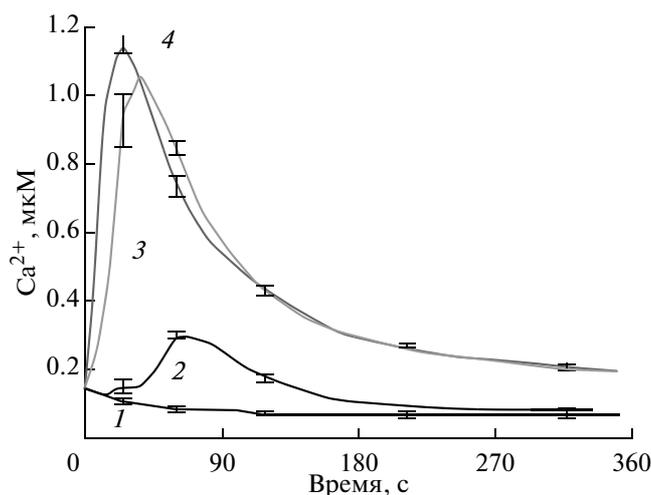


Рис. 6. Влияние амфотерицина на динамику развития Ca^{2+} -ответа в клетках *A. awamori*. Время одного цикла – 11.6 с. Концентрации амфотерицина (мкМ): 1 – 0 (контроль); 2 – 2.5; 3 – 10; 4 – 20. Результаты представляют среднее \pm стандартная ошибка. Опыты проводили с использованием протокола повторных измерений.

внутриклеточных резервуаров [17]. Также было показано, что в регуляции Ca^{2+} -транспорта у микромицета принимают участие факторы межклеточной коммуникации, в частности алкилоксибензолы (АОБ), синтезируемые рядом бактерий и дрожжей [20]. Алкилоксибензолы, также как амфотерицин, обладают мембранотропными свойствами [21]. Их гидрофобный длинноцепочечный гомолог (С6-АОБ) индуцировал повышение содержания Ca^{2+} в цитозоле *A. awamori* с длительным поддержанием его уровня [22]. В других экспериментах было показано, что как фактор межклеточной коммуникации этот гомолог АОБ исполняет функции аллармонов – сигналов тревоги, имитирующих стрессорные воздействия [23]. Его эффект на физиологическую активность микроорганизмов также, как и действие амфотерицина, было дозозависимо, он в низких концентрациях стимулировал, в высоких – ингибировал метаболическую активность клеток тестерных микроорганизмов [24]. Выявленная нами сопряженность возрастания пула Ca^{2+} в клетках *A. awamori*, обработанных амфотерицином, с дозозависимым ингибированием роста и развития культуры микромицета, достаточно аналогична действию длинноцепочечных алкилоксибензолов. Полученные данные ставят вопрос о дальнейшем изучении действия амфотерицина как микробного метаболита, участвующего в клеточной коммуникации микроорганизмов на уровне микробного сообщества.

Выявленные в настоящем исследовании изменения пула кальция в клетках *A. awamori*, подвергнутых стрессорному воздействию амфотерицина

обусловлены его свойствами характерными для полиеновых антибиотиков, взаимодействие которых с мембранными липидами сопряжено с образованием пор для ионов и неэлектролитов. Так, антибиотик филипин, имеющий много общих свойств с амфотерицином, при воздействии на плоские фосфолипидные бислоиные мембраны, способствовал увеличению трансмембранной проводимости в 10^4 – 10^5 раз. При малых концентрациях филипина (10^{-7} М) в мембранах обнаруживались одиночные ионные поры, а при комбинированном воздействии филипина с амфотерицином В – ионные поры, находящиеся в открытом состоянии [25]. Таким образом, результаты наших исследований, продемонстрировавшие влияние ростиингибирующих доз фунгицида на повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле *A. awamori*, согласуются с данными литературы о способности амфотерицина, равно как и других мембранотропных веществ, индуцировать изменения проницаемости клеточных мембран для ионов.

Одним из парадоксов кальциевых сигнальных систем является то, что с одной стороны при стрессорных воздействиях необходимо повышение пула кальция в клетке для генерации сигнала, с другой стороны, длительное сохранение высокой концентрации его в цитоплазме может быть летально для клетки вследствие нарушения ее энергетики за счет связывания ионов кальция с фосфатами [26]. В связи с этим, показанное ингибирование роста и развития гриба *A. awamori* высокими дозами амфотерицина коррелирует с повышением и длительным поддержанием высокого уровня Ca^{2+} в цитозоле микромицета. Эта выявленная корреляция ростиингибиторного эффекта амфотерицина с Ca^{2+} -ответом клеток микромицета делает перспективным разработку тест-системы для скрининга соединений с фунгицидной активностью на основе мутантного штамма *A. awamori* с рекомбинантным экворинном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркович Н.А., Кононова Г.Л. Литические ферменты *Trichoderma* и их роль при защите растений от грибных болезней (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 4. С. 389–400.
2. Markovitch N.A., Kononova G.L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review // Appl. Biochem. Microbiol. 2003. V. 39. № 4. P. 341–351.
3. Монастырский О.А. Токсины фитопатогенных грибов // Защита растений. 1996. № 8. С. 12–14.
4. Chryssanthou E., Loebig A., Sjolín J. Post-antifungal effect of amphotericin B and voriconazole against germinated *Aspergillus fumigatus* conidia // J. Antimicrob. Chemother. 2008. V. 61. P. 1309–1311.
5. Johnson E.M., Oakley K.L., Radford S.A., Moore C.B., Warn P., Warnock D.W., Genning D.W. Lack of correlation of *in vitro* amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection // J. Antimicrob. Chemother. 2000. V. 45. P. 85–93.
6. Meletiadi J., Al-Saigh R., Velegraki A., Walsh T.S., Roilides E., Zerva L. Pharmacodynamic effects of stimulated standard doses of antifungal drug against *Aspergillus* species in a new *in vitro* pharmacokinetic. Pharmacodynamic model // J. Antimicrob. Chemotherapy. 2012. V. 56. P. 403–410.
7. Касумов Х.М. Современные представления о механизме действия полиеновых антибиотиков – взаимосвязь между структурой и функцией // Антибиотики. 1981. Т. 26. № 2. С. 143–155.
8. Samedova A.A., Kasumov Kh.M. The relationship between the structure and function of polyene antibiotics as physiologically active substances // Eastern Med. J. 1998. V. 3. № 1–2.
9. Cerella C., Diederich M., Ghibelli L. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival // Int. J. Cell Biol. 2010. Article ID 546163. DOI: 10.1155/2010/546163
10. Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 2. С. 1–24.
11. Medvedev S.S. Calcium signaling system in plants // Russian J. Plant Physiol. 2005. V. 52. № 2. P. 249–270.
12. Дерябина Ю.И., Баженова Е.Н., Звягильская Р.А. Выход кальция из митохондрий дрожжей *Endomyces magnusii* // Биохимия. 2000. Т. 65. № 12. С. 1380–1388.
13. Deryabina Y.I., Zvyagil'skaya R.A. The Ca^{2+} transport system of yeast (*Endomyces magnusii*) mitochondria: independent pathways for Ca^{2+} uptake and release // Biochemistry (Moscow). 2000. V. 65. № 12. P. 1352–1356.
14. Kajitani N., Kobuchi H., Fujita H., Yano H., Fujiwara T., Yasuda T., Utsumi K. Mechanism of A23187-induced apoptosis in HL-60 cells: dependency on mitochondrial permeability transition but not on NADPH oxidase // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. № 11. P. 2701–2711.
15. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 284–293.
16. Bras M., Queenan B., Susin S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying // Biochemistry (Moscow). 2005. V. 70. № 2. P. 231–239.
17. Nelson G., Kozlova-Zwinderman O., Kollis A.G., Knight M.R., Fincham J.R.S., Stanger C.R., Renwick A., Hessian J.G.M., Punt P.J., van den Hondel C.A.M.J.J., Read N.D. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin // Mol. Microbiol. 2004. V. 52. P. 1437–1450.
18. Vogel H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N) // Microbial Gen. Bull. 1956. V. 51. P. 107–124.
19. Билай В.И. Определение роста и биосинтетической активности грибов // Методы экспериментальной микологии. К.: Наукова думка, 1982. С. 138–152.
20. Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. Recombinant aequorin as a probe for cytosolic free Ca^{2+} in *Escherichia coli* // FEBS Lett. 1991. V. 282. P. 408–412.
21. Козлова О.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г., Ник Руд, Эль-Регистан Г.И. Анализ Ca^{2+} -ответа мицелиальных грибов на внешние воздействия с использованием рекомбинантного экворина // Микробиология. 2004. Т. 73. № 6. С. 734–740.

- Kozlova O.V., Egorov S.Yu., Kupriyanova-Ashina F.G., Nick R., El-Registan G.I.* Analysis of the Ca^{2+} response of mycelial fungi to external effects by the recombinant aequorin method // *Microbiology*. 2004. V. 73. № 6. P. 629–634.
18. *Barabas G., Szabo G.* Effect of penicillin on streptomycin production by *Streptomyces griseus* // *J. Antimicrob. Chemother.* 1977. V. 11. P. 392–395.
19. *Сарис Н.-Е.Л., Карафали Э.* Роль митохондрий в перераспределении внутриклеточного кальция // *Биохимия*. 2005. Т. 70. № 2. С. 231–239.
Saris N.E.L., Carafoli E.A. Historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 2. P. 187–194.
20. *Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И.* Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456.
El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Galchenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // *Microbiology*. 2006. V. 75. № 4. P. 380–389.
21. *Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Шмидт М.А., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И.* Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе мтафилокков на стрессовые воздействия // *Микробиология*. 2002. Т. 71. № 1. С. 23–29.
P'inskaya O.N., Kolpakov A.I., Shmidt M.A., Doroshenko E.V., Mulyukin A.L., El'-Registan G.I. The role of bacterial growth autoregulators (alkyl hydroxybenzenes) in the response of staphylococci to stresses // *Microbiology*. 2002. V. 71. № 1. P. 18–23.
22. *Козлова О.В., Куприянова-Ашина Ф.Г., Егоров С.Ю., Эль-Регистан Г.И.* Влияние химического аналога микробных аутоингибиторов анабиоза на Ca^{2+} -ответ мицелиальных грибов // *Микробиология*. 2004. Т. 73. № 6. С. 741–750.
Kozlova O.V., Kupriyanova-Ashina F.G., Egorov S.Yu., El-Registan G.I. Effect of a chemical analogue of auto-inducers of microbial anabiosis on the Ca^{2+} response of mycelial fungi // *Microbiology*. 2004. V. 73. № 6. P. 635–642.
23. *Голод Н.А., Лойко Н.Г., Лобанов К.В., Миронов А.С., Воёикова Т.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И.* Роль микробных ауторегуляторов — алкилоксибензолов, в контроле экспрессии стрессовых регулонов // *Микробиология*. 2009. Т. 78. № 6. С. 731–741.
Golod N.A., Loiko N.G., Lobanov K.V., Mironov A.S., Voieikova T.A., Galchenko V.F., Nikolaev Yu. A., El-Registan G.I. Involvement of alkylhydroxybenzenes, microbial autoregulators, in controlling the expression of stress regulons // *Microbiology*. 2009. V. 78. № 6. P. 678–688.
24. *Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И.* Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 489–496.
Nikolaev Yu.A., Mulyukin A.L., Stepanenko I.Yu., El-Registan G.I. Autoregulation of stress response in microorganisms // *Microbiology*. 2006. V. 7. № 4. P. 420–426.
25. *Самедова А.А., Касумов Х.М., Султанова Г.Г.* Механизм действия полиенового мембранноактивного антибиотика филипина, биохимические аспекты его изучения на клеточных мембранах // *Успехи современного естествознания*. 2008. № 9. С. 99–100.
26. *Gadd G.M.* Signal transduction in fungi // *The growing fungus* / Eds. Gow N.A.R., Gad G.M. Chapman & Hall: London, 1995. P. 183–210.

Changes in Growth Patterns and Intracellular Calcium Concentrations in *Aspergillus awamori* Treated with Amphotericin B

A. A. Abd El-Rahman^a, O. V. Kozlova^b, S. M. A. El-Shafei^a, F. K. Alimova^c, and F. G. Kupriyanova-Ashina^{c, 1}

^a Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Minia University, El-Minia, Egypt

^b Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, United Kingdom

^c Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Received October 13, 2013

Abstract—Growth patterns and intracellular Ca^{2+} concentrations in the mutant strain *Aspergillus awamori* 66A, containing a recombinant aequorin gene were studied in the presence of a permeabilizing fungicidal agent amphotericin B. The cell response, i.e., changes in the growth and development of the fungus (initiation of spore germination, mycelial growth, and intensity of sporulation) was dose-dependent. Low concentrations of amphotericin B (2.5 μM) stimulated spore germination: the number of germinating spores was 2–3 times higher than in the control (without the fungicide). At higher amphotericin concentrations (20 μM) spore germination was inhibited. Amphotericin B had a dose-dependent effect on mycelial growth and sporulation intensity on solid Vogel medium. Intracellular Ca^{2+} concentrations in the presence of amphotericin B were investigated using the luminescence of the photoprotein aequorin. High concentrations of amphotericin B (10 and 20 μM) were shown to cause an instantaneous increase in Ca^{2+} concentrations, compared to the control and lower amphotericin concentration (2.5 μM). Ca^{2+} concentrations remained elevated throughout the experiment and correlated with the inhibition of mycelial growth and development.

Keywords: *Aspergillus awamori*, recombinant aequorin, permeabilizing fungicide, amphotericin B, cell response, sporulation, Ca^{2+} , signaling, Ca^{2+} dynamics

¹ Corresponding author; e-mail: flera.ashina@kpfu.ru