

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ, ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Материалы III Всероссийской научной конференции
с международным участием
(21–23 сентября 2021 г.)

Уфа
РИЦ БашГУ
2021

УДК 575:577:60
ББК 28.0
С56

*Печатается по решению кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ.
Протокол № 2 от 09.09.2021 г.*

Редакционная коллегия:

д-р биол. наук, профессор **Р.Г. Фархутдинов** (*отв. ред.*);
канд. биол. наук, доцент **И.А. Шпирная**;
канд. биол. наук, доцент **В.О. Цветков**

Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии:

С56 Материалы III Всероссийской научной конференции с международным участием (г. Уфа, 21-23 сентября 2021 г.)
/ отв. ред. Р.Г. Фархутдинов. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2021. – 258 с.
ISBN 978-5-7477-5333-4

В сборнике представлены материалы докладов участников конференции, которые вносят значительный вклад в решение научно-практических задач молекулярной биологии и биотехнологии.

Статьи приводятся в авторской редакции. Авторы несут ответственность за патентную чистоту, достоверность и точность приведенных фактов, цитат, экономико-статистических данных, собственных имен, географических названий и прочих сведений, а также за разглашение данных, не подлежащих открытой публикации.

Предназначено для сотрудников академических учреждений, преподавателей вузов, аспирантов и студентов.

УДК 575:577:60
ББК 28.0

ISBN 978-5-7477-5333-4

© БашГУ, 2021

Содержание

Sasan Aliniaiefard. Proper lighting condition for photosynthesis, yield and quality of horticultural crops in controlled environments	10
Ю.Э. Азарова, Е.Ю. Клёсова, А.В. Полоников. Роль полиморфного варианта rs4430796 гена HNF1B в формировании предрасположенности к сахарному диабету 2 типа и его осложнениям	11
Ч.Р. Аллагулова, А.М. Авальбаев, Д.Р. Масленникова, Р.А. Юлдашев, А.Р. Лубянова, М.В. Безрукова, О.В. Ласточкина, Ф.М. Шакирова. Вклад гормональных перестроек в проявление защитного действия оксида азота на растения пшеницы при обезвоживании	15
Э.А. Баймухаметова, Д.Ю. Швец, Х.Г. Мусин, Б.Р. Кулуев. Снижение степени окислительного коричневления эксплантов при <i>in vitro</i> культивировании хлопчатника	19
Н.В. Балюк, Ж.Н. Калацкая, Н.А. Ламан. Антивирусная активность, накопление пролина и фенольных соединений в растениях картофеля при обработке биопрепаратами	23
В.Ю. Буслаев, В.И. Минина, В.Г. Дружинин, В.П. Волобаев, Е.Д. Баранова, П.С. Деменков. Особенности состава лёгочного микробиома в связи с цитогенетическими изменениями у больных аденокарциномой лёгкого	28
О.Ю. Бушуева, Е.М. Барышева, А.В. Марков, Ю.А. Королёва, Е.О. Чуркин, М.С. Назаренко, А.В. Полоников, В.П. Иванов. Роль генов антиоксидантной системы в формировании предрасположенности к развитию цереброваскулярных заболеваний: анализ ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов и метилирования ДНК	32
Е.В. Валеева, О.А. Кравцова. Динамика активности экспрессии генов серотонинергической, глутаматергической системы и генов нейропластичного пути в разных моделях хронического стресса	37
А.А. Галимова, Е.А. Заикина, Н.И. Лещенко, И.Д. Кузнецов, Б.Р. Кулуев. Генетический анализ хлебопекарных качеств мягкой пшеницы	42
И.Р. Галин, О.А. Сельдимирова. Морфогенез <i>in vitro</i> в каллусах ячменя: влияние флуридона	46
Е.Е. Галкина, О.А. Воробьева. Особенности биосинтеза фитостеролов пальмы ползучей и тыквы обыкновенной, как компонентов лекарственных средств	52
М.И. Гарипова, С.А. Башкатов, Л.М. Хабибуллина. Кортизол как биомаркер черт темперамента подростков	56

И.Ф. Головацкая, Р.А. Городова, Е.В. Бойко, И.Н. Плюснин, М.К. Кадырбаев. Мелатонин снижает токсичность меди для растений огурца	59
Ю.Д. Давыдова, А.В. Казанцева, Р.Ф. Еникеева, Р.Н. Мустафин, М.М. Лобаскова, С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова. Вовлечённость генов медиаторов воспаления в формирование индивидуальных различий в уровне депрессивности	64
М.А. Джаубермезов, Э.Т. Мингажева, А.Б. Якупова, Н.В. Екомасова, Э.К. Хуснутдинова. Анализ распространения полиморфного варианта rs5219 гена KCNJ11 в популяции ингушей	68
И.Е. Дубовик, М.Ю. Шарипова, В.А. Гафарова, Е.А. Наумкин. Процесс биокоррозии стали и влияние на него электромагнитного поля	72
Р.Ф. Еникеева, А.В. Казанцева, Ю.Д. Давыдова, Р.Н. Мустафин, З.Р. Тахирова, М.М. Лобаскова, А.В. Михайлова, К.С. Федореева, С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова. Вовлечённость генов медиаторов воспаления в формирование невербального интеллекта: эффект аполипопротеина Е	77
А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова. Идентификация мутаций у больных незавершенным остеогенезом из Республики Башкортостан	82
Б.Р. Ибрагимов, Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова. Особенности клеточной гибели моноцитов больных атопической бронхиальной астмой	86
Г.А. Ивахова. Современные проблемы устранения микоплазменной контаминации клеточных линий эукариот в лабораторных условиях	93
А.В. Казанцева, Р.Ф. Еникеева, Ю.Д. Давыдова, Р.Н. Мустафин, З.Р. Тахирова, М.М. Лобаскова, Л.Т. Гарданова, К.С. Федореева, С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова. Роль генов регуляции синаптической пластичности в формировании особенностей пространственного мышления человека	98
Ж.Н. Калацкая, Е.Л. Недведь, Н.В. Балюк, К.М. Герасимович, Е.И. Рыбинская, И.А. Овчинников, Н.А. Копылова, Л.Г. Яруллина, Н.А. Ламан. Ответные реакции растений картофеля при обработке смесями бактерий <i>Bacillus subtilis</i> с иммуномодуляторами в условиях водного дефицита и вирусного заражения	103
А.С. Киселева, У.А. Галиханова. Оценка влияния стевиозида на прорастание семян и рост проростков <i>Rhodiola rosea</i> в культуре in vitro	109
Е.Ю. Клёсова, Ю.Э. Азарова, А.В. Полоников. Полиморфные варианты гена NOX1 и риск развития сахарного диабета второго типа	114
О.В. Кочетова, З.А. Шангареева, Т.Т. Ахметкиреева, Г.Ф. Корытина. Роль гена NPY в развитии ожирения и нарушения пищевого поведения у детей	118

О.В. Ласточкина, Д.Р. Масленникова, Д.Ю. Гаршина. Индукция засухоустойчивости растений <i>Triticum aestivum</i> L. (пшеницы) разных агроэкологических групп эндодифитными бактериями <i>Bacillus subtilis</i>	123
А.П. Лобода, Н.А. Барлев. Влияние внеклеточного матрикса на активность транскрипционного фактора эпителиально-мезенхимального перехода Zeb1 при раке молочной железы	129
А.Р. Лубянова, М.В. Безрукова, Ф.М. Шакирова. Влияние 24-эпибрассинолида на водный обмен растений пшеницы при дефиците воды	135
Е.В. Михайлова, М.Ю. Шеин, В.Ю. Алексеев. Роль глутатион-S-трансфераз в растениях семейства Капустных	140
А.Р. Мухаметгалиева, П. Массон. Изучение механизмов ингибирования холинэстераз высокими концентрациями положительно заряженных субстратов при конкурирующей кинетике	144
А.Ю. Никулин, В.Б. Багмет, В.Ю. Никулин, Ш.Р. Абдуллин. Изучение разнообразия водорослей в почвах под растительностью с Бамбучником на острове Итуруп с использованием молекулярно-генетического подхода	147
А.Х. Нургалиева, Л.Ф. Галлямова, Р.Ф. Саттаров, Ш.М. Хуснутдинов, Д.Д. Сакаева, Э.К. Хуснутдинова. Полногеномное секвенирование экзома образцов ДНК больных раком желудка	153
Л.В. Осипова, И.В. Верниченко, Т.Л. Курносова, И.А. Быковская, А.А. Лапушкина. Онтогенетические закономерности реализации устойчивости яровой пшеницы при действии абиотического стресса	159
Г.Ф. Рафикова, Е.В. Кузина, Т.Ю. Коршунова. Комплексы микромицетов при биоремедиации нефтезагрязненной почвы при засолении с применением микробных композиций	164
В.И. Румянцева, В.В. Виноградов. Подход к повышению эффективности производственного процесса с использованием объемных композитных структур	169
В.И. Румянцева, Е.И. Кошель. Актуальная стратегия эрадикации сформированных биопленок при использовании магнитных наноструктур	174
О.Н. Савельева, А.С. Карунас, Ю.Ю. Федорова, Э.И. Эткина, Э.К. Хуснутдинова. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, с развитием бронхиальной астмы у детей	179
А.М. Сагитов, Б.Р. Кулуев, А.В. Чемерис. Крым-сагыз – полузабытый каучуконос и его латинские названия	184

З.Р. Саитова. Влияние природно-климатических условий на популяции лишайника <i>Physcia stellaris</i> (L.) Nyl.	189
Ю.Г. Самойлова, О.А. Олейник, Е.В. Саган, Н.С. Денисов. Клинико-лабораторные и биохимические аспекты диагностики кардиоваскулярных осложнений у детей и подростков с ожирением	196
В.С. Сергеев, Л.Ф. Миннебаев, Д.В. Гарифуллина. Инновационные разработки НВП «БашИнком» для защиты и питания растений	204
З.Ю. Сираева, Е.А. Булыгина, Р.К. Исмагилова, О.А. Кравцова. Метагеномный анализ структуры прокариотных сообществ горизонтов почв при No-Till технологии	207
Ю.М. Сотникова, Р.Г. Фархутдинов. Влияния нефтяного загрязнения на всхожесть и морфометрические показатели растений семейства <i>Fabaceae</i>	215
Г.И. Хаматдинова, К.М. Сигова, В.В. Федяев, М.И. Гарипова, Р.Г. Фархутдинов. Влияние высоких концентраций $CoCl_2$, $Co(II)$ - и $Co(III)$ ЭДТА на редокс-метаболизм и дыхание растений пшеницы	219
Р.Р. Хисамова, Х.Г. Мусин, Р.Г. Фархутдинов. Применение ISSR-маркеров для выявления и оценки генетической дифференциации популяций липы мелколистной на территории Республики Башкортостан	222
С.Е. Храпов, З.И. Абрамова. Роль аутофагии в преждевременном старении клеток НМРЛ, индуцированном окислительным стрессом	227
Ю.В. Шарифьянова, Е.В. Михайлова. Проблемы и перспективы оценки генетического разнообразия листовенниц	231
И.А. Шпирная, В.О. Цветков, Н.Д. Рябцева. Методы количественного анализа гидролитической активности с использованием гелей с иммобилизованным субстратом	234
А.В. Шуганова, И.А. Шпирная. Биологическая активность β -глюканов базидиальных грибов	240
В.В. Эрдман, И.А. Туктарова, К.В. Данилко, Я.Р. Тимашева, Т.В. Викторова, Т.Р. Насибуллин. Полигенный анализ генетических маркеров долголетия с использованием программы APSampler	245
Л.Г. Яруллина, Е.А. Заикина, В.О. Цветков, Г.Ф. Бурханова, Е.А. Черепанова, А.В. Сорокань, И.С. Марданшин, Ж.Н. Калацкая, Н.В. Балюк. Влияние бактерий <i>Bacillus subtilis</i> в сочетании с сигнальными молекулами на содержание пролина и транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при стрессе	251

Предисловие
к изданию сборника материалов конференции
«Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии»,
посвященной памяти профессора Р.И. Ибрагимова

В настоящем издании представлены материалы докладов участников III Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии».

Посвящение конференции Ринату Исмагиловичу Ибрагимову (1956–2018) связано с юбилейной датой, 65-летием со дня его рождения и признанием его заслуг в развитии биологического факультета БашГУ, в научной и педагогической деятельности.

Р.И. Ибрагимов – доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, Почетный работник высшего профессионального образования Российской Федерации. С 2000 по 2017 г. Ринат Исмагилович являлся бессменным заведующим кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета и в течение 12 лет возглавлял биологический факультет (2001–2013 гг.).

При поддержке Рината Исмагиловича в 2010 году на биологическом факультете Башкирского государственного университета была организована кафедра генетики и фундаментальной медицины, которую возглавила д.б.н., профессор, академик АН РБ, член-корреспондент РАО Э.К. Хустнутдинова. Преподаватели кафедры генетики и фундаментальной медицины активно занимаются научно-исследовательской деятельностью в различных направлениях медицинской генетики: онкогенетика; поиск структурных особенностей генов наследственных заболеваний; популяционная генетика; фармакогенетика и др. Результаты исследований опубликованы в высокорейтинговых журналах Q1 (Nature, Science) и других научных изданиях мирового уровня. Сотрудники и аспиранты кафедры регулярно становятся обладателями исследовательских грантов, академических стипендий, участвуют в зарубежных стажировках. Научные исследования Эльзы Камилевны и сотрудников кафедры поддержаны международными и российскими организациями (INTAS, Евросоюз, Foundation of Alexander von Humboldt, Президиум РАН, РФФИ, РГНФ, ФЦП, РНФ) и выполняются в сотрудничестве с Центром молекулярной медицины и генетики в Калифорнии (Ирвайн), Эстонским биоцентром (Тарту), Медицинской школой Ганновера (Германия), Институтом молекулярной биологии им. М. Планка в Германии (Геттинген), Институтом молекулярной генетики во Франции (Лион) и ERASMUS Университетом в Роттердаме (Нидерланды).

В 2020 году был отмечен 10-летний юбилей кафедры.

В 2013 году по инициативе Р.И. Ибрагимова была проведена I Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы биохимии и биотехнологии»; в 2014 году – Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – от науки к практике».

II Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии» была организована в 2018 году совместными усилиями сотрудников кафедры биохимии и биотехнологии и кафедры генетики и фундаментальной медицины БашГУ.

Первоначально проведение очередной, III конференции было запланировано на 2020 г., но обстановка в стране и мире внесла свои коррективы в наши планы. Несмотря на это, в 2020 г. в рамках конференции была опубликована часть материалов в журналах «Биомика» и «Доклады Башкирского университета».

В 2021 году в журнале «Биомика» (№ 2) вышла в свет приуроченная ко времени проведения конференции статья «Памяти профессора Ибрагимова Рината Исмагиловича – к 65-летию со дня рождения» (<https://biomicsj.ru/archive/2021/tom-13-2/682/>).

Значительное организационное и финансовое содействие в проведении конференции оказало руководство Башкирского государственного университета и ООО «НВП «БашИнком». Мы выражаем им искреннюю благодарность за помощь в организации научного мероприятия.

Научно-внедренческое предприятие «БашИнком» – одно из крупнейших биотехнологических предприятий России, СНГ и Европы, которое ведет совместную работу с 50 НИИ и университетами в области разработки и испытания эффективности биопрепаратов и биоактивированных удобрений. Предприятие имеет пять научно-исследовательских лабораторий, в которых исследованиями в области биотехнологии, физиологии растений, агрохимии, фитопатологии и селекции микроорганизмов занимаются 28 докторов и кандидатов наук. «БашИнком» оказывает многолетнюю поддержку в проведении различных мероприятий на биологическом факультете БашГУ и принимает активное участие в профессиональной подготовке студентов.

Сердечно благодарим за поддержку, сотрудничество и активное участие – редакцию журнала «Биомика», редакцию журнала «Доклады Башкирского университета», коллег из лабораторий Уфимского Института биологии и Института биохимии и генетики УФИЦ РАН.

Оргкомитет конференции



Р.И. Ибрагимов

Proper lighting condition for photosynthesis, yield and quality of horticultural crops in controlled environments

© Sasan AliniaEIFARD

Photosynthesis and Light Reactions Laboratory, Department of Horticultural Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran, Iran

Email: aliniaEIFARD@ut.ac.ir

Keywords: Controlled Environments, Greenhouse Crops, Light, Light Intensity, Light Quality, Photoperiod, Photosynthesis

Light as an energy source for photosynthesis determines the growth, morphology, development and yield of crops. Tendency to produce crops in controlled environments that equipped with artificial light has been increased nowadays. Different characteristics of light including intensity, spectrum and photoperiod are the determining factors for the growth, morphology and yield of crops. In a series of researches done in the photosynthesis and light reactions laboratory of University of Tehran on the role of different lighting conditions on diverse greenhouse crops such as: tomato, lettuce, basil, savory, rose, chrysanthemum, petunia, anthurium, gerbera, carnation, marigold and different types of bromeliads with various photosynthetic metabolisms under controlled environments (e.g. greenhouse, growth chambers and vertical farms), it were shown that different properties of light have significant effects on growth, physiology and yield of the mentioned crops. Furthermore, plant's resistance to various abiotic stresses, including high light intensity, gaseous pollutants, salinity and drought was also affected by growth lighting environment. The results showed that the light spectrum in the range of 600 to 700 nm increases the growth and yield of most of the mentioned crops and on the other hand the growth of plants exposed to the waveband range of 400 to 500 nm is often restricted. Despite the positive effects of the light spectrum in the range of 600 to 700 nm on plant growth, due to the negative effects of this spectrum range on photosynthesis and plant morphology (red light syndrome), lighting environment with red region waveband should be combined with the light spectrum range of 400 to 500 nm. Far red light region of the spectrum caused elongation of internodes. Despite of the negative effects of far red light on the growth and quality of crops, it positively affected the response of plants to stresses. Intensity and quality of light play a significant role in the sensitivity of the plant to diverse abiotic stresses (including drought, gaseous pollutants, salinity and cold). Also, it was found that extending the photoperiod or use of supplemental light on greenhouse crops positively influenced production and quality of the harvested product. The quality of the greenhouse crops was also affected by the spectrum and intensity of the lighting environment. For example, low intensity of ultraviolet light in preharvest stage caused positive impact on postharvest quality of lettuce. Furthermore, application of ultraviolet light on savory plants resulted in an increase in the amount of essential oil. In cut carnation flowers, the best postharvest quality was obtained under blue light, while for plants such as roses and anthuriums (during cold storage), the best quality was obtained under red light or a high percentage of the red light spectral range. Red light by generation of small-sized stomata with narrow aperture restricted the water loss of the leaves. There was a positive relationship between biophysical traits of photosynthesis with postharvest water loss of the leaves that can be used as an index for prediction of postharvest longevity of this flower. In conclusion, it is important to manage lighting condition in the greenhouses and other controlled environments to optimize the production and quality of horticultural crops.

Роль полиморфного варианта rs4430796 гена *HNF1B* в формировании предрасположенности к сахарному диабету второго типа и его осложнениям

© Ю.Э. Азарова*, Е.Ю. Клёсова, А.В. Полоников

*Курский государственный медицинский университет
Россия, 305041 г. Курск, улица Карла Маркса, 3.*

**Email: azzzzar@yandex.ru*

Установлена ассоциация локуса rs4430796 с риском развития сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии в русской популяции.

Ключевые слова: *HNF1B*, однонуклеотидный полиморфизм, индекс массы тела, глутатион, перекись водорода, С-пептид, сахарный диабет 2 типа

Всемирная организация здравоохранения в своем Первом глобальном докладе о ситуации в области неинфекционных заболеваний от 2014 г. определила сахарный диабет (СД) как одну из наиболее опасных неинфекционных эпидемий XXI века наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, а также хроническими обструктивными болезнями легких (World Health Organization, 2010). Это связано с тем, что заболеваемость диабетом неуклонно растет во всем мире, охватив к 2020 г уже каждого 11-го жителя планеты, что составляет почти 9% населения Земного Шара. Хорошо известно, что хроническая гипергликемия при СД2 сопровождается развитием окислительного стресса и является одним из ведущих факторов риска развития мозгового инсульта, инфаркта миокарда, а также является основной причиной потери зрения, нетравматических ампутаций и развития терминальных стадий почечной недостаточности. Факт наличия генетической составляющей в развитии диабета и его осложнений не вызывает сомнений. Одним из полиморфных вариантов, обнаруженных в полногеномном исследовании СД2 в Европейской популяции, является SNP rs4430796 (A>G) в интроне гена *HNF1B* [2]. *HNF1B*, или транскрипционный фактор 2 (TCF2), принадлежит к семейству гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов, непосредственно контролирующих развитие поджелудочной железы, печени и почек [3-4]. Функциональные партнеры *HNF1B* показаны на рисунке 1.

В целом, литературные данные о связи *HNF1B* с показателями углеводного обмена и редокс-гомеостаза противоречивы. Целью настоящей работы стало изучение ассоциации однонуклеотидного варианта rs4430796 гена *HNF1B* с биохимическими показателями плазмы крови, а также с риском СД2 и его осложнений у больных и здоровых лиц.

В исследование вошли 1579 больных СД2, получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи с декабря 2016 по октябрь 2019 гг. Группу контроля составили 1627 здоровых индивидов, - доноров областной станции переливания крови. У всех участников исследования проводили однократный забор 10 мл крови натощак в вакуумные пробирки с ЭДТА (для генетического тестирования) и гепарином лития (для биохимического анализа). Геномную ДНК выделяли колоночным методом с помощью набора QIAamp DNA blood kit (QIAGEN) на автоматической станции QiaCube (QIAGEN),

Германия). Генотипирование полиморфизма гена *HNF1B* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4 (Agena Bioscience, США). Концентрации перекиси водорода и глутатиона в плазме крови определяли с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay kit (Cell Biolabs), GSH/GSSG Assay kit (Abcam) флуориметрическим методом на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, С-пептида, общего холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛВП, ЛНП) и триацилглицеролов (ТАГ) определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) стандартными наборами реагентов фирмы «Диакон-ДС» (Россия). Ассоциации генотипов с риском СД2 изучали методом логистической регрессии с поправкой на пол, возраст и ИМТ с помощью программы SNPStats [5].

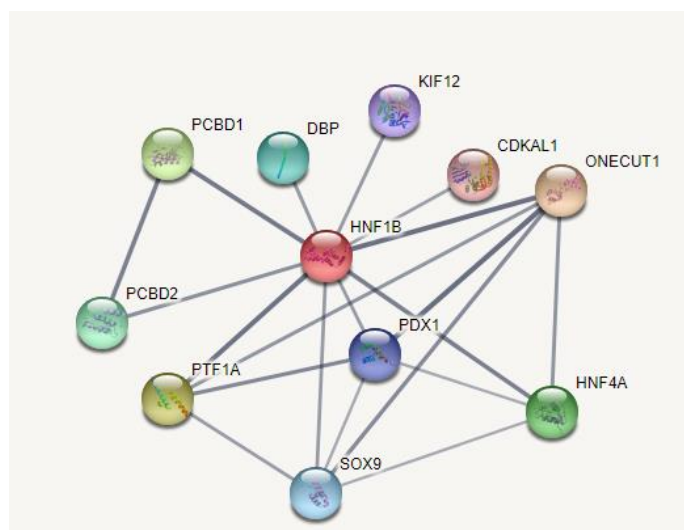


Рис. 1. Сеть белков, образуемая HNF1B: PTF1A — панкреатический транскрипционный фактор, альфа-субъединица; ONECUT1 – гепатоцитарный ядерный фактор 6; PCBD1 — птерин-4-альфа-карбиноламиндегидратаза 1; PCBD2 — птерин-4-альфа-карбиноламиндегидратаза 2; HNF4A — гепатоцитарный ядерный фактор 4-альфа; DBP – D-сайт связывающий белок; SOX9 – SRY-бокс транскрипционный фактор 9; PDX1 – белок 1 гомеобокса поджелудочной железы/двенадцатиперстной кишки; KIF12 – кинезин-подобный белок 12; CDKAL1 – треонилкарбамоиладенозин-ТРНК-метилтиотрансфераза.

Исследованный SNP находился в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($P > 0,05$). Линейный регрессионный анализ выявил ассоциацию генотипов A/G-G/G rs4430796 с повышенным риском развития СД2 (OR 1,21, 95CI 1,04-1,40, $P = 0,014$). Ассоциация осталась значимой и после введения поправок на пол, возраст и ИМТ (OR 1,24, 95CI 1,05-1,47, $P = 0,011$). Носители генотипа G/G имеют повышенный риск развития диабетической нефропатии (OR 1,53, 95CI 1,04-2,24, $P = 0,024$), тогда как ассоциации полиморфного локуса rs4430796 с другими микро- и макрососудистыми осложнениями СД2 выявлено не было ($P > 0,05$).

При анализе взаимосвязей между генотипами *HNF1B* и биохимическими показателями больных СД2 было обнаружено, что изучаемый SNP ассоциирован с повышенным содержанием перекиси водорода ($P = 0,012$) и более низким уровнем общего глутатиона плазмы ($P = 0,041$) у женщин, тогда как у мужчин с СД2 генотип G/G связан со снижением концентрации С-пептида ($P = 0,004$) и повышением концентрации глюкозы крови ($P = 0,015$). Кроме того, у носителей минорного аллеля G концентрация мочевого

кислоты в плазме крови была на 21,1 мкмоль/л выше, чем у носителей генотипа A/A ($P=0,034$). Согласно данным ресурса BioGPS, *HNF1B* экспрессируется в широком спектре тканей и обладает наибольшей экспрессией в поджелудочной железе. Анализ эффектов rs4430796 на уровень метилирования гена *HNF1B*, выполненный с помощью инструмента mQTLdb, показал, что альтернативный аллель G связан с гиперметилированием гена при рождении ($P=2,08 \cdot 10^{-35}$), в детском ($P=1,42 \cdot 10^{-48}$) и взрослом возрасте ($P=1,07 \cdot 10^{-45}$), а значит, ассоциирован с меньшей транскрипционной активностью *HNF1B* в эти периоды жизни. С помощью онлайн-программы GTEx Portal, мы провели анализ тканеспецифичных эффектов минорного аллеля G изучаемого SNP и обнаружили, что носители генотипа G/G имеют более низкую экспрессию *HNF1B* в поджелудочной железе (Рисунок 2).

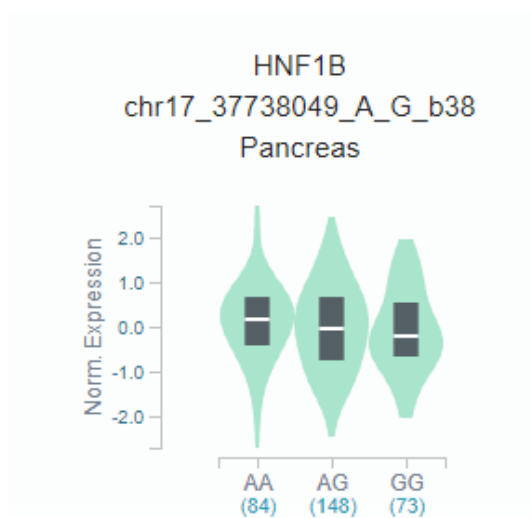


Рис. 2. Экспрессия *HNF1B* у носителей различных генотипов rs4430796 (GTEx Portal)

Таким образом, в проведенном исследовании впервые в русской популяции установлена ассоциация rs4430796 гена *HNF1B* с повышенным риском развития СД2 и диабетической нефропатии. Механизм взаимосвязи данных вариантов с заболеванием объясняется менее выраженным синтезом этого транскрипционного фактора у носителей минорного аллеля G, что проявляется снижением концентрации С-пептида, повышением концентрации глюкозы и перекиси водорода в плазме крови. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего изучения генетико-биохимических особенностей метаболизма при СД2 и поиска новых молекулярных мишеней для антиоксидантной и сахароснижающей терапии и профилактики болезни.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-15-00227).

Литература

1. World Health Organization et al. Global status report on noncommunicable diseases 2014. – World Health Organization, 2014. – №. WHO/NMH/NVI/15.1.
2. Gudmundsson J., Sulem P., Steinthorsdottir V., Bergthorsson J.T., Thorleifsson G., Manolescu A. et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39: 977-983.

3. Edghill E.L., Bingham C., Ellard S., Hattersley A.T. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J Med Genet* 2006; 43: 84-90. doi.org/10.1136/jmg.2005.032854.
4. Wu G., Bohn S., Ryffel G.U. The HNF1Beta transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/lim1-induced kidney malformations. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3715-3728. doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04312.x.
5. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22(15): 1928-1929. doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268.

The role of the polymorphic variant rs4430796 at *HNF1B* gene in the formation of predisposition to type 2 diabetes and its complications

I. Azarova*, E. Klyosova, A. Polonikov

*Kursk State Medical University
3 Karl Marx Street, 305041 Kursk, Russia.*

**Email: azzzzar@yandex.ru*

An association of the rs4430796 locus with the risk of developing type 2 diabetes and diabetic nephropathy in the Russian population has been established.

Keywords: HNF1B, single nucleotide polymorphism, body mass index, glutathione, hydrogen peroxide, C-peptide, type 2 diabetes mellitus.

Вклад гормональных перестроек в проявление защитного действия оксида азота на растения пшеницы при обезвоживании

© Ч.Р. Аллагулова, А.М. Авальбаев, Д.Р. Масленникова, Р.А. Юлдашев, А.Р. Лубянова, М.В. Безрукова, О.В. Ласточкина, Ф.М. Шакирова

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71,

Email: allagulova-chulpan@rambler.ru

В работе было продемонстрировано защитное и рост-стимулирующее действие оксида азота на растения пшеницы при воздействии обезвоживания. Положительные эффекты NO могут быть связаны с его влиянием на состояние гормональной системы растений пшеницы.

Ключевые слова: оксид азота, пшеница, обезвоживание, устойчивость, фитогормоны.

Засуха принадлежит к наиболее широко распространенным и непредсказуемым экстремальным явлениям, оказывающим негативное действие на все звенья растительного метаболизма, вызывая существенное снижение урожайности сельскохозяйственных культур, включая пшеницу. С целью повышения продуктивности и устойчивости культурных растений к неблагоприятным внешним воздействиям на практике широко применяются химические средства, которые могут представлять серьезную угрозу для окружающей среды и здоровья человека. В качестве альтернативы агрохимикатам интерес представляют природные регуляторы роста, поскольку они являются естественными для растительных организмов соединениями и проявляют свою эффективность в чрезвычайно низких концентрациях, что имеет важное значение для поддержания всеобщей экологической безопасности. Важным природным соединением, вовлекаемым в регуляцию фундаментальных процессов растительного метаболизма, является оксид азота (NO). Он принимает участие в регуляции клеточного цикла растений, прорастания семян, вегетативного роста, морфогенеза, цветения, плодоношения и старения (Карпец и др., 2017; Corpas et al., 2020; Kolbert et al., 2021;). Особый интерес к NO вызван его участием в формировании устойчивости растений к разным по природе стрессовым факторам, включая засуху (Lau et al., 2021). В качестве донора эндогенного NO с целью изучения его эффектов на растения широко применяется нитропруссид натрия (SNP – sodium nitroprusside) (Мамаева и др., 2015). Ранее нами было выявлено, SNP в концентрации 200 мкМ способствует повышению устойчивости растений пшеницы к засолению (Масленникова и др., 2017). Данная работа посвящена исследованию эффектов SNP (200 мкМ) на интенсивность ростовых процессов и гормональный статус проростков пшеницы, подвергнутых действию засухи, моделируемой с помощью 12%-гополиэтиленгликоля (ПЭГ).

Объектом исследования служили 4–5 суточные растения пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев. 3-суточные проростки предобрабатывали в течение 24 ч раствором 200 мкМ SNP. Затем подвергали водному стрессу с использованием неинного осмотика полиэтиленгликоля (ПЭГ) в концентрации 12 %. О росте судили по показателям сырой и сухой массы проростков. Количественную оценку свободных фитогормо-

нов проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (Масленникова и др., 2017).

Важным показателем рост-стимулирующего и защитного действия регуляторных соединений являются данные о росте растений. В связи с этим был проведен анализ ростовых параметров проростков пшеницы, предобработанных SNP в норме и при воздействии обезвоживания, моделируемого обработкой ПЭГ. Результаты опытов показали, что предобработка проростков донором NO оказала на них рост-стимулирующее, о чем судили по значениям сырой и сухой массы растений пшеницы. Стрессовая обработка, заметно тормозила рост проростков, что отразилось и на их показателях сырой и сухой массы. Предобработанные SNP и подвергнутые обезвоживанию растения характеризовались существенно меньшим уровнем повреждающего действия стрепса на показатели роста (Рис. 1). Полученные результаты согласуются с полученными ранее данными о рост-стимулирующем и протекторном действии оксида азота на рост разных видов растений, включая пшеницу (Масленникова и др., 2017; Lau et al., 2021).

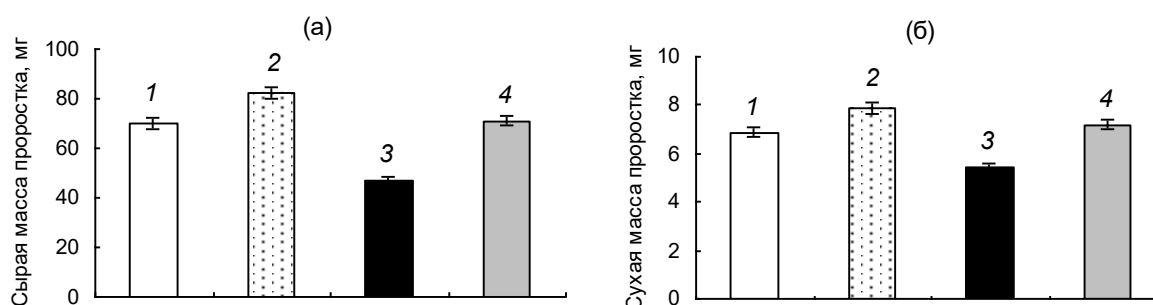


Рис. 1. Показатели сырой (а) и сухой массы (б) 5-суточных проростков предобработанных 200 мкMSNP, подвергнутых воздействию 12%-ного ПЭГ в течение 24 ч. 1 – Контроль; 2 – SNP; 3 – 12% ПЭГ; 4 – SNP + 12% ПЭГ

Рост-стимулирующее и защитное действие оксида азота на растения пшеницы можно объяснить его влиянием на состояние гормональной системы, поскольку ей отводится ведущая роль в регулировании процессов роста и развития растений. В связи с чем важно было провести анализ влияния донора NO на гормональный статус проростков пшеницы в норме и в условиях моделируемой ПЭГ засухи. Результаты экспериментов показали, что уже к первому часу обработки проростков 200 мкM SNP в нормальных для произрастания условиях наблюдалось двукратное увеличение содержания гормонов цитокининовой природы и некоторое повышение уровня АБК на фоне отсутствия значимых изменений в содержании ИУК. При этом важно подчеркнуть, что повышенный вдвое уровень содержания цитокининов поддерживался в ходе всего опыта (Рис.2).

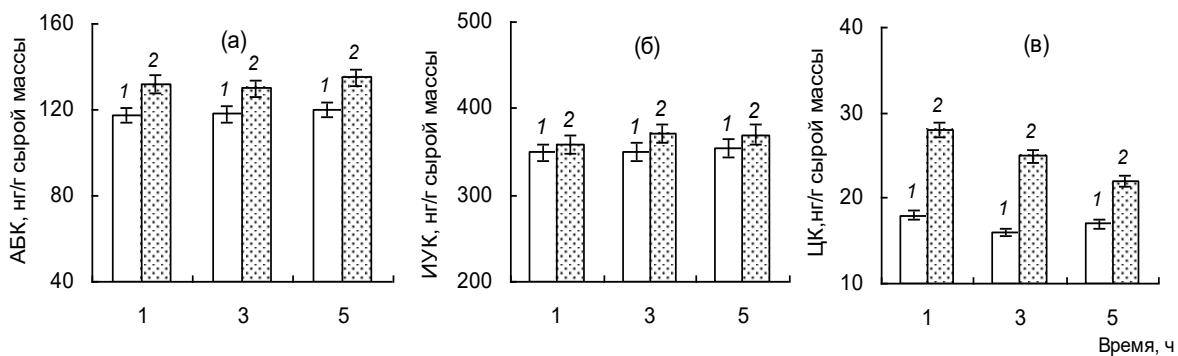


Рис.2. Динамика содержания АБК (а), ИУК (б) и цитокининов (в) в проростках пшеницы в ходе обработки 200 мкМ SNP в течение 1, 3, 5 ч в нормальных условиях произрастания. 1 –Контроль; 2 – 200 мкМ SNP.

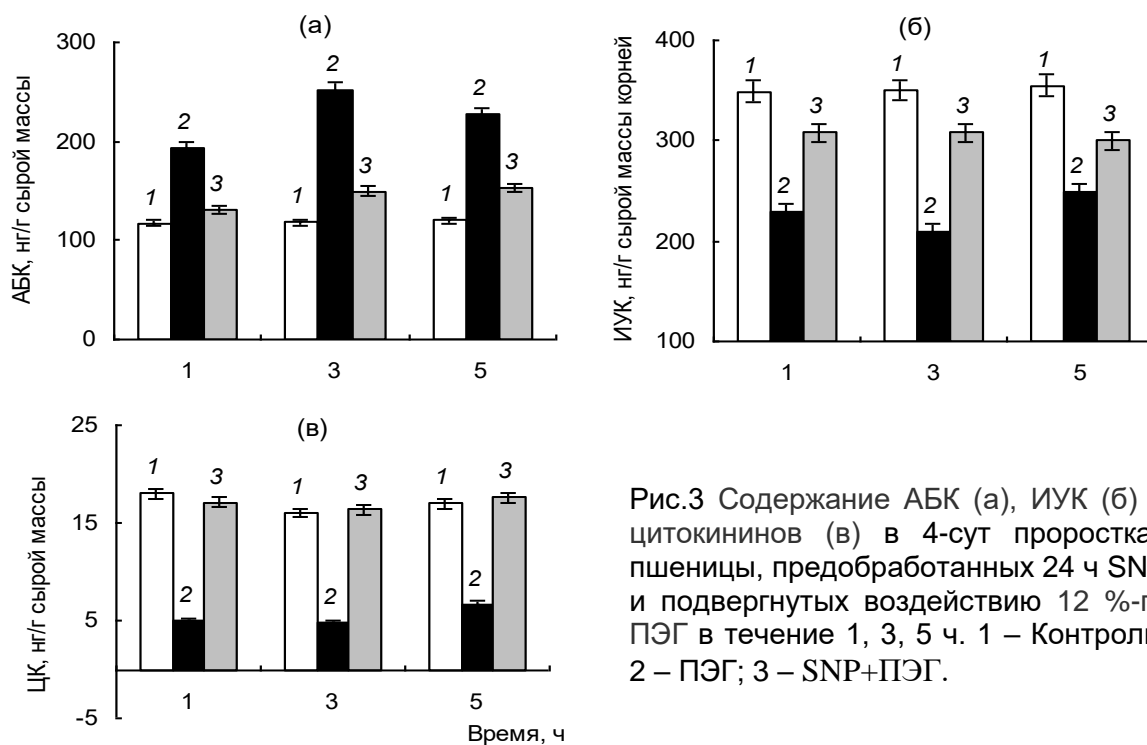


Рис.3 Содержание АБК (а), ИУК (б) и цитокининов (в) в 4-сут проростках пшеницы, предобработанных 24 ч SNP и подвергнутых воздействию 12 %-го ПЭГ в течение 1, 3, 5 ч. 1 – Контроль; 2 – ПЭГ; 3 – SNP+ПЭГ.

Обезвоживание вызвало в проростках существенное накопление АБК, снижение содержания ИУК и цитокининов, тогда как SNP-предобработанные и подвергнутые стрессу растения характеризовались снижением уровня стресс-индуцированного накопления АБК, уменьшением падения содержания ИУК, а также и поддержанием концентрации цитокининов на уровне, сопоставимым с контрольными.

Совокупность полученных данных свидетельствуют о том, что донор оксида азота нитропруссид натрия в концентрации 200 мкМ характеризуется сочетанием свойств стимулятора роста растений пшеницы и индуктора их устойчивости к условиям обезвоживания, индуцируемого обработкой ПЭГ. Важный вклад в проявление рост-стимулирующего и защитного действия оксида азота на растения пшеницы связано с его влиянием на состояние гормональной системы проростков в норме и при обезвоживании. Особого внимания привлекают данные двукратного цитокининов в проростках в ходе их SNP-обработки в нормальных условиях произрастания и предотвраще-

ния стресс-индуцируемого падения уровня цитокининов в предобработанных SNP растениях пшеницы.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А21-121011990120-7 и при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00904.

Литература

1. Corpas F., González-Gordo S., Palma J. Nitric oxide: A radical molecule with potential biotechnological applications in fruit ripening // *Journal of Biotechnology*. 2020. V. 324. P. 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.020>
2. Kolbert Zs., Lindermayr Ch., Loake G. The role of nitric oxide in plant biology: current insights and future perspectives // *Journal of Experimental Botany*. 2021. V. 72. P. 777–780. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab013>.
3. Lau S. E., Hamdan, M. F., Pua, T. L., Saidi, N. B., Tan, B. C Plant nitric oxide signaling under drought stress // *Plants*. 2021. V. 10 (2). P. 360. <https://doi.org/10.3390/plants10020360>
4. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Функциональное взаимодействие оксида азота с активными формами кислорода и ионами кальция при формировании адаптивных реакций растений // *Вестник харьковского национального университета*. 2017. Т. 2. С. 6-31. <http://hdl.handle.net/123456789/1333>
5. Мамаева А. С., Фоменков А. А., Носов А. В. и др. Регуляторная роль оксида азота у растений // *Физиология растений*. 2015. Т. 62. С. 459-459. DOI:10.7868/S0015330315040132
6. Масленникова Д. Р., Аллагулова Ч. Р., Федорова К. А., Плотников А. А., Авальбаев А. М., Шакирова Ф. М. Вклад цитокининов в реализацию рост-стимулирующего и протекторного действия оксида азота на растения пшеницы // *Физиология растений*. 2017. 64(5). С.355-362.

Contribution of hormonal changes to the protective effects of nitric oxide on wheat plants during dehydration

C.R. Allagulova, A.M. Avalbaev, D.R. Maslennikova, R.A. Yuldashev, A.R. Lubyanova, M.V. Bezrukova, O. V. Lastochkina, F.M. Shakirova

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia, Pr. Oktyabrya, 71,

**Email: allagulova-chulpan@rambler.ru*

The protective and growth-stimulating effect of nitric oxide on dehydrated wheat plants has been demonstrated. The positive effects of NO may be related to its effect on the hormonal system of wheat plants.

Key words: nitric oxide, wheat, dehydration, resistance, phytohormones.

Снижение степени окислительного коричневления эксплантов при *in vitro* культивировании хлопчатника

© Э.А. Баймухаметова^{1*}, Д.Ю. Швец², Х.Г. Мусин¹, Б.Р. Кулуев^{1,2}

¹ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, Проспект Октября, 71, лит. 1Е.

² Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

*Email: elvina.baimuhametova@yandex.ru

Исследовалось воздействие различных химических соединений на степень окислительного коричневления эксплантов и каллусов хлопчатника при *in vitro* культивировании. Наиболее эффективным ингибитором коричневления эксплантов оказался активированный уголь (200 мг/л).

Ключевые слова: хлопчатник, фенольные соединения, окислительное коричневление, агробактериальная трансформация.

Одной из частых проблем, возникающих при *in vitro* культивировании многих видов растений, в том числе и хлопчатника *Gossypium hirsutum* L., является потемнение (коричневение) растительных тканей [2]. Причиной этого является активный синтез веществ фенольной природы с их последующим окислением, в результате чего, в клетках появляются окрашенные полимерные фенольные соединения, негативно влияющие на эффективность генетической трансформации и регенерации растений [3, 7]. Однако, несмотря на высокую распространенность окислительного коричневления, на сегодняшний день нет универсального способа борьбы с ним. Чаще всего используется метод модификации питательных сред различными химическими веществами, способными препятствовать окислению фенольных соединений – антиоксиданты, либо связывать их, препятствуя их дальнейшему окислению – адсорбенты [6].

Целью данной работы являлось исследование влияния ряда химических соединений, наиболее широко применяющихся для решения данной проблемы, на степень окислительного коричневления эксплантов хлопчатника при *in vitro* культивировании. Для этого семядольные экспланты хлопчатника сорта Юлдуз, характеризующегося повышенным коричневлением, помещались в чашки Петри с питательной средой Мурасиге-Скуга, дополненной: активированным углем (200 мг/л), аскорбиновой кислотой (10 мг/л), тиосульфатом натрия (250 мг/л), нитратом серебра (7 мг/л), поливинилпирролидом (10 мг/л). Экспланты в течение месяца культивировались на данных средах, после чего проводилась визуальная оценка степени коричневления питательной среды и эксплантов.

Известно, что тиосульфат натрия, аскорбиновая кислота и нитрат серебра при добавлении в питательные среды оказывают антиоксидантное действие, препятствуя окислению выделяющихся в питательную среду фенольных соединений [1, 4, 5]. Однако в данном эксперименте они показали различную эффективность в выбранных концентрациях. Так, аскорбиновая кислота, широко применяющаяся для сокращения коричневления тканей ряда растений при *in vitro* культивировании, в выбранной концентрации

не оказала значимого эффекта на коричневение тканей хлопчатника. Экспланты, содержащиеся на среде с аскорбиновой кислотой, а также образующиеся на них каллусы, темнели и постепенно погибали (рис. 1Б).

Снижению степени коричневения эксплантов способствовал нитрат серебра, однако большинство образующихся на эксплантах каллусов были гидратированными (рис. 1А).

Лишь добавление в питательную среду тиосульфата натрия в концентрации 250 мг/л способствовало сокращению коричневения эксплантов хлопчатника без влияния на характер образующихся каллусов (рис. 1В).



Рис.1. Экспланты хлопчатника, растущие на среде, содержащей: А – нитрат серебра (7 мг/л), Б – аскорбиновую кислоту (10 мг/л), В – тиосульфат натрия (250 мг/л).

Помимо антиокислителей для борьбы с коричневением можно использовать адсорбенты, такие как ПВП и активированный уголь [8]. ПВП – высокомолекулярный водорастворимый полимер, способный связывать фенольные соединения, образуя с ними водородные связи и, тем самым, препятствуя их дальнейшему окислению. Чаще всего при культивировании растительных тканей используют ПВП с молекулярной массой 40000. Однако добавление ПВП в концентрации 10 мг/л в среду для культивирования хлопчатника не препятствовало, а даже способствовало коричневению эксплантов хлопчатника. Более того, использование ПВП приводило к снижению эффективности каллусообразования.

Обратный эффект оказывал активированный уголь – экспланты, растущие на содержащих его средах, оставались зелеными и не темнели, также в эксплантах наблюдалось активное образование каллусов.

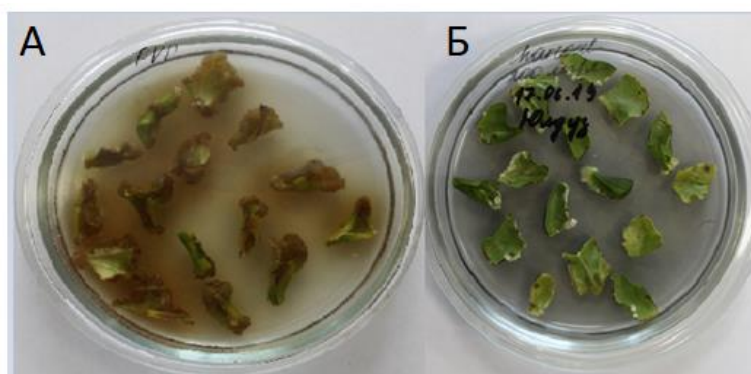


Рис.2. Экспланты хлопчатника сорта Юлдуз, растущие на среде, содержащей: А – поливинилпирролидон, Б – активированный уголь.

Таким образом, в ходе эксперимента было показано, что для снижения степени коричневления растительных тканей хлопчатника при *in vitro* культивировании эффективны активированный уголь и тиосульфат натрия в выбранных концентрациях. Интересно, что аскорбиновая кислота (антиокислитель) и ПВП (адсобент), эффективно снижающие потемнение тканей ряда других культур, коричневление эксплантов хлопчатника не подавляли. Более того, ПВП в данных экспериментах даже оказывал стимулирующий эффект на коричневление эксплантов.

Можно сделать вывод о том, что целесообразно для каждого вида, сорта растений, а иногда и для типа эксплантов эмпирическим путем подбирать условия культивирования с целью предотвращения окислительного потемнения тканей *in vitro*. Многие вещества, активно справляющиеся с описанной проблемой при выращивании одной культуры, могут негативно влиять на каллусогенез и регенерацию других культур, что непременно следует учитывать при выборе метода борьбы с окислительным потемнением растительных тканей.

Таким образом, в наших экспериментах наиболее эффективным компонентом для снижения потемнения эксплантов хлопчатника при *in vitro* культивировании оказался активированный уголь.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119021190011-0.

Литература

1. Скапцов М.В., Балабова Д.В., Куцев М.Г. Оптимизация сред для культивирования растений *in vitro* на примере щавеля водного *Rumex aquaticus* L. // Сельскохозяйственная биология. 2014. №1. С. 32–35.
2. Ali H.M., El-Gizawy A.M., El-Bassiouny R.E., Saleh M.A. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products// Journal of food science and technology. 2015. Vol. 52. No. 6. Pp. 3651–3659.
3. Feng J.T., Zhi-yi Z., Jun Z., Na Y., Dmei W. Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. // Forestry Studies in China. 2007. Vol. 9. No. 4. Pp. 279–282.
4. Kumar G.P., Sivakumar S., Siva1 G., et al. Silver nitrate promotes high-frequency multiple shoot regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by inhibiting ethylene production and phenolic secretion // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2016. Vol. 52. No. 4. Pp. 408–418.
5. Ndakidemi C.F., Mneney E., Alois P., Ndakidemi A. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments // American Journal of Plant Sciences. 2014. Vol. 5. No. 1. Pp. 187–191.
6. Rana M.M., Han Z.X., Song D.P., et al. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis* // International Journal of Molecular Sciences. 2016. Vol. 17. No. 7. Pp. 1–18.
7. Saengnil K., Lueangprasert K., Uthaibutra J. Control of enzymatic browning of harvested 'hong huay' litchi fruit with hot water and oxalic acid dips // ScienceAsia. 2006. Vol. 32. No. 4. Pp. 345–350.
8. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Current opinion in plant biology. 2002. Vol. 5. No. 3. Pp. 218–223.

Decrease in the degree of oxidative browning of explants during *in vitro* cultivation of cotton

E. A. Baimukhametova^{1*}, D. Yu. Shvets², Kh. G. Musin¹, B. R. Kuluev^{1,2}

¹ *Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

² *Bashkir State University
32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Email: elvina.baimuhametova@yandex.ru

The effect of various chemical compounds on the degree of oxidative browning of cotton explants and calli during *in vitro* cultivation was studied. Activated carbon (200 mg / l) proved to be the most effective.

Keywords: cotton, phenolic compounds, oxidative browning, agrobacterial transformation.

Антивирусная активность, накопление пролина и фенольных соединений в растениях картофеля при обработке биопрепаратами

© Н.В. Балюк, Ж.Н. Калацкая, Н.А. Ламан

Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси»
220072, г. Минск, ул. Академическая 27, Беларусь

E-mail: balyuck.natalya@yandex.ru

Изучены особенности формирования антивирусной устойчивости картофеля при обработке биопрепаратами «Мультифаг», «Бактоstim» и «Полибакт». Отмечено снижение степени заражения γ -вирусом на 20,5% при опрыскивании листьев биопрепаратом «Мультифаг» в концентрации 2×10^7 КОЕ/мл, при этом содержание фенольных соединений оставалось на уровне здоровых растений, а накопление пролина увеличилось на 25,5% по отношению к зараженным растениям.

Ключевые слова: антивирусная устойчивость, γ вирус картофеля, *Solanum tuberosum* L., биопрепараты, пролин, фенольные соединения

В естественной среде обитания рост и развитие растений происходит в условиях постоянных изменений внешних факторов, способных оказывать неблагоприятное воздействие на растительный организм. Существенные потери урожая и заметное снижение качества продукции картофеля связаны с заражением вирусами. Так, например, широко распространённый γ вирус картофеля, может вызывать снижение урожайности культуры более чем на 50% [1,2].

Одним из путей экологически безопасного повышения устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям является применение непатогенных ризосферных бактерий. Показано, что ростстимулирующие бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas* индуцируют системную устойчивость растений к широкому кругу абиотических стрессоров, в том числе к засухе, засолению, тяжелым металлам [3], выявлены штаммы, проявляющие активность против бактериальных и грибных инфекций, однако в научной литературе недостаточно сведений о проявлении ими антивирусной активности, их влиянии на распространение и накопление вирусов в растительных тканях [4].

Цель данного исследования заключалась в изучении биохимических изменений и степени вирусного заражения растений картофеля при их обработке биопрепаратами белорусского производства, имеющих высокую антагонистическую активность к ряду фитопатогенов бактериальной природы.

Опыты проведены на микроклонально размноженных растениях картофеля сорта Бриз. Адаптацию растений-регенерантов осуществляли на почвогрунте на основе верхового торфа с добавлением элементов питания в виде минеральных солей. Адаптированные растения обрабатывали путем опрыскивания листовой поверхности биопрепаратами «Мультифаг» (вирионы *Consortium Pseudomonas phages Pf-C*, производство Институт микробиологии НАН Беларуси), «Бактоstim» (споры и продукты метаболизма бактерий *Bacillus amyloliquefaciens*, производство Институт микробиологии НАН Бела-

руси), «Полибакт» (2 штамма спорообразующих бактерий *Bacillus amyloliquefaciens*, штамм бактерий *Pseudomonas brassicacearum*, штамм азотфиксирующих бактерий *Brevibacillus sp.*, штамм фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus megaterium*) в концентрации 2×10^7 КОЕ/мл. Заражение вирусом YBK проводили путём натирания клеточным соком доноров растений картофеля при помощи мелкозернистой наждачной бумаги через 3 суток после обработки препаратами. Определение содержания пролина проводили по методу Bates с соавт. [5], накопление фотосинтетических пигментов определяли в 96%-ном этиловом спирте по Lichtenthaler, K. [6]. Суммы фенольных соединений определяли согласно методу [7], который основан на реакции фенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу. Вирус YBK картофеля определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции [8]. Пробы отбирали через 14 дней после инфицирования.

Обработка растений картофеля биопрепаратами «Полибакт» и «Бактостим» способствовала увеличению накопления YBK вируса в листьях на 20,4% и 25,8% соответственно по отношению к инфицированному контролю. При опрыскивании растений биопрепаратом «Мультифаг» наблюдалось снижение содержанию вируса на 20,5% по отношению к зараженному контролю (рис. 1).

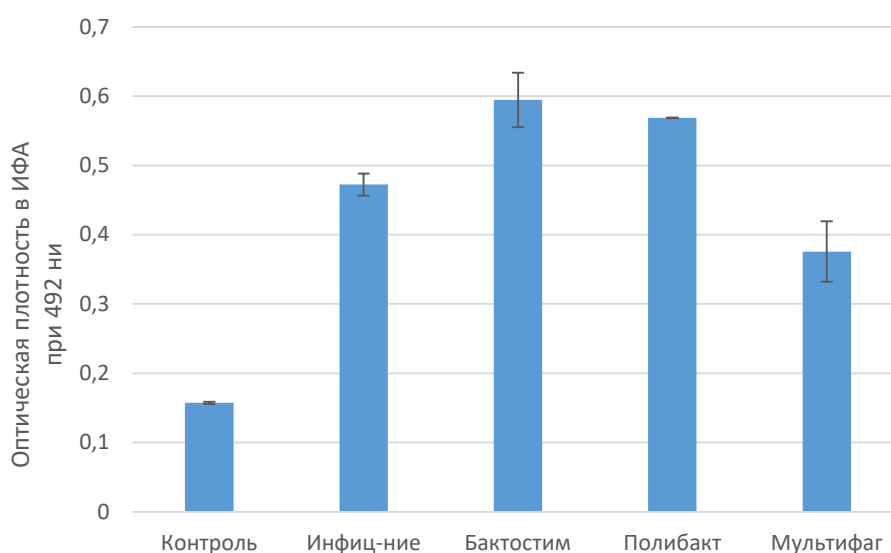


Рис. 1. Среднее значение оптической плотности в ИФА зараженных Y-вирусом листьев растений картофеля при обработке биопрепаратами

Во всех исследуемых вариантах наблюдалось увеличение содержания фотосинтетических пигментов. Максимальных эффект наблюдался в инфицированных варианте (на 24,2% выше по отношению к неинфицированным растениям), что, вероятно, указывает на компенсационный эффект ущерба, причиненного репликацией вируса в зараженных листьях [9]. Известно, что накопление фенольных соединений является важным звеном формирования защитных реакций против патогенов [10, 11]. В зараженных растениях картофеля наблюдалось максимальное накопление фенольных соединений по сравнению с неинфицированным контролем. При обработке биопрепаратом «Бактостим» не отмечено достоверно значимых различий относительно инфицированных растений по содержанию фенольных соединений. Опрыскивание препаратами «Поли-

бакт» и «Мультифаг» вызвали уменьшение содержания фенольных соединений на 17,0% и 19,8% по сравнению с зараженными растениями (рис.2 А).

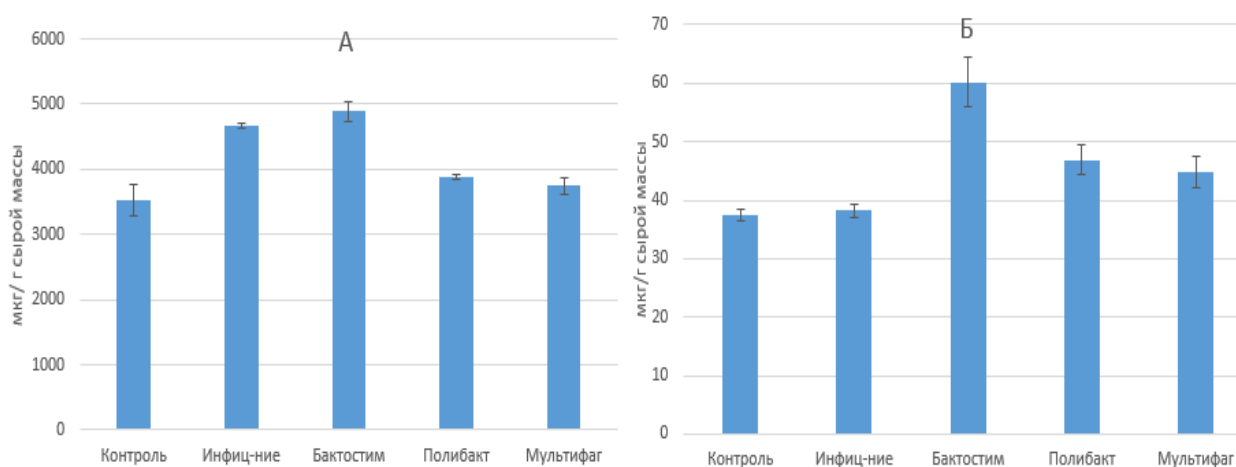


Рис. 2. Содержание фенольных соединений (А) и пролина (Б) в зараженных Y-вирусом листьях картофеля при обработке биопрепаратами

Экологические стрессы вызывают накопление пролина у самых разных видов [12, 13]. Вирусы являются важными модуляторами содержания аминокислот в инфицированных клетках, и метаболизм аминокислот имеет решающее значение в реакции растений на инфекцию. Например, в табаке уровни аланина, пролина повышаются как в листьях, инфицированных локально, так и в листьях с системной приобретенной устойчивостью к вирусу табачной мозаики [14]. В наших исследованиях не отмечено увеличения содержания пролина при инфицировании листьев Y-вирусом картофеля. Максимальное увеличение пролина на 57,5% по сравнению с инфицированными контрольными растениями наблюдалось при применении препарата «Бактостим» на основе *Bacillus amyloliquefaciens*. Биопрепараты «Мультифаг» и «Полибакт» также способствовали повышению содержания пролина соответственно на 25,5% и 20,1% по отношению к инфицированным растениям.

Таким образом, при применении биопрепарата «Мультифаг» отмечено снижение степени заражения Y-вирусом картофеля в листьях на 20,5%, при этом содержание фенольных соединений оставалось на уровне неинфицированных растений, а накопление пролина увеличилось на 25,5% по отношению к инфицированным растениям. Опрыскивание листьев картофеля биопрепаратом «Бактостим» вызвало увеличение содержания вирусных частиц на 25,8%. На фоне обработки биопрепаратом выявлено увеличение содержания пролина на 57,5% по сравнению с зараженными растениями. Для понимания полученных эффектов требуется проведение дополнительных исследований с расширением спектра биохимических показателей.

Выражаем благодарность сотрудникам РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» и Института микробиологии НАН Беларуси за предоставленный вирусный материал и биопрепараты.

Литература

1. Анисимов Б.В., Белов Г. Л., Варицев Ю. А., Еланский Б. В. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Картофелевод. 2009. 272 с.
2. Макарова С.С., Макаров В.В., Тальянский М.Э Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т.21. №1. С.62–73.
3. Cherif H., Marasco R, Rolli E., Ferjani R., Fusi M., Soussi A., Mapelli F., Blilou I., Borin S., Boudabous A., Cherif A., Daffonchio D., Ouzari H. Oasis desert farming selects environment-specific date palm root endophytic communities and cultivable bacteria that promote resistance to drought: oasis palm endophytes promote drought resistance // Environ. Microbiol. Rep. 2015. V.7. P.668–678.
4. Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. Эндофитные бактерии *Bacillus spp.* с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам / И. Максимов и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т.23. №7.
5. Bates L. S., Waldren R. P., Teare J. D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies // Plant and Soil. 1973. V.39. №1. P.205–207.
6. Lichtenthaler, K. and Welburn, A.R. Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents // Biochemical Society Transactions. 1983. V.11. P.591–592.
7. Singleton, V.L. and Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent // Am. J. Enol. Viticult. 1965. V.16. P.144–158.
8. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля / Рос. с.-х. акад. НПО по картофелеводству. М.: Коренево, 2016. 8с.
9. Ghobrial W. N., Ahlam A. Mehesen, Jehan M. Abass, Shalaby M. E, Omar A. F. Potential impacts of *Rhizobium* and compost tea enriched with Rhizobacteria for enhancing protection of fabae bean against *Broad bean mottle virus (BBMV)* // J. Agric. Res. Kafer EL-Sheikh. 2009. V.35. P.20–38.
10. Mondal, S. and Mitva, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors // Physiology and Molecular Plant Pathology, 2007. V.71. P.200–201.
11. Balogun O. S. and Teraoka T. Time-Course Analysis of the Accumulation of Phenols in Tomato Seedlings Infected with Potato Virus X and Tobacco mosaic virus // Biokem. 2004. V.16, №2. P.112–120.
12. Csonka L.N., Hanson A.D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology // Annu. Rev. Microbiol. 1991. V.45. P.569–606.
13. Dörffling K., Schulenburg S., Lesselich G., Dörffling H. Abscisic acid and proline levels in cold hardened winter wheat leaves in relation to variety e specific differences in freezing resistance // J. Agro. Crop Sci. 1990. V.165. P.230–239.

14. Choi YH, Kim HK, Linthorst HJ, Hollander JG, Lefeber AW, Erkelens C, Nuzillard JM, Verpoorte R. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves // J. Nat. Prod. 2006. V.69. P.742–748.

Antiviral activity and accumulation of proline and phenolic compounds in potato plants treated with biologics

*N. V. Baliuk, J. N. Kalatskaja, N. A. Laman

V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus

220072, Minsk, Akademicheskaya str. 27, Belarus

*E-mail: *balyuck.natalya@yandex.ru*

The features of the formation of potatoes antiviral resistance in conditions of treatment with “Multiphage”, “Bactostim” and “Polybact” biologics were investigated. Observed was a 20.5% decrease in the degree of Y-virus infection when spraying the leaves with a 2×10^7 CFU/ml “Multiphage” biologics. At that, the content of phenolic compounds remained at the healthy plants level, and the proline accumulation were increased by 25.5% comparing to infected plants.

Keywords: antiviral activity, *Solanum tuberosum* L., Y- potato virus, biologics, proline, phenolic compounds

Особенности состава лёгочного микробиома в связи с цитогенетическими изменениями у больных аденокарциномой лёгкого

© В.Ю. Буслаев^{1*}, В.И. Минина^{1,2}, В.Г. Дружинин², В.П. Волобаев², Е.Д. Баранова², П.С. Деменков³

¹ *ФИЦ угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Институт экологии человека
Россия, 650000 г. Кемерово, проспект Советский, 18*

² *Кемеровский государственный университет
Россия, 650000 г. Кемерово, улица Красная, 6*

³ *ФИЦ институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Россия, 630000 г. Новосибирск, проспект Академика Коптюга, 2*

*E-mail: vladislasbus2358@yandex.ru

В настоящее время активно рассматривается роль изменений состава микробиоты в развитии многочисленных патологий, в том числе и связанных со злокачественными новообразованиями. Доноры с высоким уровнем хромосомных повреждений (выше 3%) характеризовались снижением численности представителей бактериального рода *Reptostreptococcus*. Данное исследование позволило установить и охарактеризовать специфический состав легочной микрофлоры при аденокарциноме легкого и определить ассоциацию его изменения с высоким уровнем повреждений генома в соматических клетках организма-хозяина.

Ключевые слова: рак лёгкого; аденокарцинома; микробиом; хромосомные aberrации.

Рак лёгкого (РЛ) является онкологическим заболеванием с высоким уровнем смертности [1]. К основным факторам риска развития РЛ относятся курение, воздействие окружающей среды и генетическая предрасположенность. Организм человека представляет собой экологическую нишу для обитания бактерий, вирусов и грибов. Сложные сообщества микроорганизмов формируют микробиоту человека. В настоящее время наблюдается увеличение числа научных работ о свойствах легочной микробиоты, в особенности её бактериального компонента. Действие факторов внешней среды, генетические особенности могут влиять на баланс микробных сообществ, которые сформировались в течение всей жизни. Микроорганизмы используют множественные стратегии для обеспечения своей выживаемости, в частности с помощью продукции гентоксинов [2]. Развитие повреждений генома организма-хозяина может прямо или опосредовано зависеть от особенностей таксономического состава бактериальных сообществ. В качестве индикатора негативного воздействия на геном используются показатели частоты хромосомных aberrаций (ХА) в соматических клетках.

В данной работе было поставлено исследование таксономического состава легочной микробиоты в связи с частотой повреждений генома в соматических клетках (лимфоцитах крови) у пациентов и здоровых индивидов. Для реализации данной цели выполнялись следующие задачи: сопоставление профилей легочной микробиоты и уровня цитогенетических повреждений пациентов с аденокарциномой и здоровых доноров.

Выявление таксонов, ассоциированных с развитием цитогенетических повреждений в составе лимфоцитов периферической крови.

В качестве материала для исследования были использованы образцы мокроты и периферической крови, взятые у 15 больных РЛ (сбор образцов производился до лечения, гистологически подтвержденный диагноз - аденокарцинома легкого) и 15 здоровых индивидов мужского пола, близкого возраста (57 лет) и статуса курения (50 % курильщиков в обеих группах).

Бактериальная ДНК выделялась из образцов мокроты с применением коммерческих наборов FastDNA Spin Kit For Soil (MP Biomedicals). Подготовку бактериальной ДНК для секвенирования осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, рекомендованному Illumina для секвенаторов MiSeq. Приготовление материала для секвенирования было осуществлено путём амплификации V3-V4 вариабельных участков генов 16S рРНК. Первый раунд амплификации осуществлялся с использованием целевых праймеров, второй раунд проводился для двойного индексирования образцов. Дальнейшую подготовку к секвенированию и секвенирование осуществляли с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (200 циклов) и прибора MiSeq (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя. Биоинформатическая обработка полученных данных производилась при помощи пакета программ QIIME2. В качестве основных репозиториях нуклеотидных последовательностей прокариот были использованы референсные базы данных SILVA и Greengenes.

Для получения хромосомных препаратов для оценки ХА использовали классический полумикрометод культивирования клеток крови. От каждого индивида анализировали 200 метафазных пластинок. Уровень ХА оценивали как отношение общего количества аберраций хромосом к числу проанализированных метафаз. За повышенный уровень ХА принимали значение более 3% согласно проведенному ранее исследованию на большой репрезентативной выборке [Minina et al., 2018]. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statsoft STATISTICA 10.0». Сравнение двух независимых групп производилось методами непараметрической статистики с учетом U-критерия Манна-Уитни.

Анализ цитогенетических данных указал на повышенную частоту ХА в клетках крови больных с РЛ легкого по сравнению со здоровыми индивидами ($4,83 \pm 3,56$ % против $2,07 \pm 1,03$ %; $p=0,002$), что согласуется с результатами ранее выполненного исследования [3]. При сопоставлении показателей состава легочной микрофлоры у пациентов и здоровых индивидов, значимые различия были получены для бактерий родов *Oribacterium*, *Capnocytophaga*, *Gemella*, *Rothia*, *Bacillus*, *Clostridium* и *Actinomyces* (Табл.).

Ранее уже проводились исследования специфики состава легочной микробиоты у больных раком легкого с определенной гистопатологической формой. Было отмечено, что бактериальные рода *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Phenylobacterium*, *Brevundimonas* и *Staphylococcus* ассоциированы с аденокарциномой легкого [4]. Недавнее исследование мокроты больных РЛ (смешанная по гистологическим формам РЛ группа) указало на возможность использования данных легочной микробиоты для диагностики РЛ в связи повышением уровня ХА в лимфоцитах крови [5]. Было установлено, что в группе доноров с высокой частотой ХА была ниже частота встречаемости бактерий рода *Atopobium* и выше частота *Alloprevotella*. Кроме того, были выявлены различия микробиоты у курящих и некурящих индивидов. У здоровых курящих доноров бактерии рода *Neisseria* регистрировались реже, чем у некурящих ($0,39 \pm 0,99$ vs $1,82 \pm 2,54$ % $p=0,03$).

Таблица. Сопоставление профилей легочной микрофлоры.

Таксон	Пациенты с аденокарциномой (%)	Здоровые индивиды (%)	p-value
Oribacterium	0,80 ± 0,77	0,27 ± 0,46	0,043
Capnocytophaga	1,87 ± 4,02	0,20 ± 0,41	0,026
Gemella	2,87 ± 2,26	1,07 ± 0,96	0,026
Rothia	1,67 ± 1,35	0,47 ± 0,52	0,011
Bacillus	2,87 ± 2,26	1,00 ± 1,00	0,020
Clostridium	0,93 ± 0,80	0,33 ± 0,49	0,032
Actinomyces	2,00 ± 1,77	0,53 ± 1,60	0,001

Примечание: В таблице представлены относительные процентные содержания таксонов при наличии статистически значимых различий между группами сравнения ($p < 0,05$).

В нашем исследовании в микробиоте больных аденокарциномой легкого с повышенным уровнем ХА статистически значимо реже регистрировались представители таксона *Peptostreptococcus* ($0,11 \pm 0,33$ %, vs $0,83 \pm 0,75$ % $p=0,03$). Это может быть обусловлено тем, что бактерии рода *Peptostreptococcus* могут снижать воспалительный процесс благодаря синтезу метаболитов индоакриловой кислоты [6]. У курящих индивидов наблюдалось снижение численности бактерий рода *Neisseria* по сравнению с некурящими ($0,50 \pm 1,29$ vs $3,06 \pm 6,38$ %, $p=0,04$) в группах больных и здоровых обследованных, что согласуется с результатами ранее выполненных исследований. Данное явление обусловлено ингибирующими эффектами табачного дыма на рост данных микроорганизмов [7].

В результате проведенного исследования были выявлены значимые различия профиля легочной микробиоты у пациентов с аденокарциномой легкого и здоровых индивидов. Изменение качественных и количественных показателей бактериальных таксонов следует отнести к возможным механизмам развития рака лёгкого. Развитие повреждений генома может потенциально быть связано с особенностями взаимодействий бактерий с компонентами иммунитета организма-хозяина.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-44-420012 p_a.

Литература

1. Barta J.A., Powell C.A., Wisnivesky J.P. Global Epidemiology of Lung Cancer // *Annals of Global Health*. 2019.Vol.85.No.1.Pp.1-16.
2. Grasso F., Frisan T. Bacterial Genotoxins: Merging the DNA Damage Response into Infection Biology // *Biomolecules*. 2015.Vol.5.No.3.Pp.1762–1782.
3. Minina V.I., Sinitsky M.Y., Druzhinin V.G., Fucic A., Bakanova M.L., Ryzhkova A.V., Savchenko Ya.A., Timofeeva A.A., Titov R.A., Voronina E.N., Volobaev V.P., Titov V.A. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution // *European Journal of Cancer Prevention*. 2018. Vol.27.No.1.Pp.6–12.
4. Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Sucena M., Sousa C., Rodrigues L.V., Teixeira G., Pinto P., de Albreu T.T., Barbara C., Semedo J., Mota L., Carvalho A.S., Mathiessen R.M., Pereira L., Seixas S. Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma // *Scientific Reports*. 2019.Vol.9.No.1.Pp.1-11.
5. Druzhinin V.G., Matskova L.V., Demenkov P.S., Baranova E.D., Volobaev V.P., Minina V.I., Apalko S.V., Churina M.A., Romanyuk S.A., Shcherbak S.G., Ivanov V.I., Larionov A.V. Taxonomic diversity of sputum microbiome in lung cancer patients and its relationship with chromosomal aberrations in blood lymphocytes // *Scientific Reports*. 2020. Vol.10. Pp.1-12.
6. Wlondarska M., Luo C., Kolde R., d'Hennezel E., Annand J.W., Heim C.E., Krastel P., Schmitt E.K., Omar A.S., Creasey E.A., Garner A.L., Mohammadi S., O'Connell D., Abubucker S., Arthur T.D., Franzosa E.A., Huttenhower C., Murphy L.O., Haiser H.J., Vlamakis H., Porter J.A., Xavier R.J. Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation // *Cell Host Microbe*. 2017. Vol.22.No. 1.Pp.25-37.
7. Ertel A., Eng R., Smith S.M. The differential effect of cigarette smoke on the growth of bacteria found in humans. *Chest*. 1991.Vol.100.No.3.Pp.628-630.

Lung microbiome composition specificity with respect to cytogenetical alterations in lung cancer patients

V.Yu Buslaev¹, V.I. Minina^{1,2}, V.G.Druzhinin², V.P. Volobaev², Baranova E.D², P.S. Demenkov³

¹ *Federal Research Centre of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology, Russia 650000 Kemerovo, Sovetskiy avenue, 18*

² *Kemerovo State University, Russia 650000 Kemerovo, Krasnaya street, 6*

³ *Federal Research Centre of Institute Cytology and Genetics, Russia 630000 Novosibirsk, Academician Koptyug avenue, 2*

*E-mail: vladislasbus2358@yandex.ru

Nowadays role of alterations in microbiota composition is actively considered in many pathologies including malignant ones. Donors with high level of chromosomal damage (over 3%) were characterized by decrease of *Peptostreptococcus* bacterial genera representatives. This research allowed to detect and characterize the specific composition of adenocarcinoma associated lung microflora and establish relationship of its alterations with high level of genome damage in somatic cells of host organism.

Keywords: lung cancer; adenocarcinoma; microbiome; chromosomal aberrations.

Роль генов антиоксидантной системы в формировании предрасположенности к развитию цереброваскулярных заболеваний: анализ ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов и метилирования ДНК

© О.Ю. Бушуева^{1*}, Е.М. Барышева¹, А.В. Марков², Ю.А. Королёва², Е.О. Чуркин², М.С. Назаренко², А.В. Полоников¹, В.П. Иванов¹

¹Курский государственный медицинский университет
Россия, 305004, г. Курск, улица К. Маркса, 3.

²Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
Россия, 634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

*Email: olga.bushueva@inbox.ru

У 378 больных мозговым инсультом и 474 здоровых индивидуумов проведена оценка ассоциаций 16-и полиморфных вариантов генов антиоксидантной системы с риском развития заболевания. Установлена связь rs1128446 *TXNRD1* (OR=1,93;95%CI=1,51-2,47); rs7493 *PON2* (OR=1,80;95%CI=1,46-2,22); rs2266782 *FMO3* (OR=1,24;95%CI=1,02-1,50) с повышенным риском развития МИ. Анализ метилирования антиоксидантных генов *TXNRD1*, *GCLM*, *GSTP1* выявил у больных МИ снижение метилирования *GSTP1* (среднего по исследованному региону показателя: 2,7 [2,3; 3,9]%) по сравнению с контрольной группой (4,4 [3,6; 7,1]%; $P=9,43 \times 10^{-6}$). Также у больных МИ отмечалось снижение метилирования гена *GCLM* (среднего по исследованному региону показателя: 5,8 [4,1; 7,1]%) по сравнению с контрольной группой (7,9 [5,3; 10,3]%; $P=0,004$).

Ключевые слова: мозговой инсульт, окислительный стресс, однонуклеотидный полиморфизм, метилирование ДНК.

Инсульт занимает третье место в структуре смертности во всем мире и является ведущим фактором снижения когнитивных функций и деменции [1]. Данные исследований, накопленные за последние десятилетия, убедительно доказывают, что окислительный стресс, связанный с избытком активных форм кислорода (АФК), является основным механизмом повреждения головного мозга при мозговом инсульте (МИ) [2]. Окислительный стресс играет важнейшую роль в патогенезе МИ из-за высокой чувствительности мозга к АФК-индуцированным повреждениям. Мозг является чувствительной мишенью по многим причинам, в том числе ввиду высокой концентрации подверженных перекисному окислению липидов, высокого уровня потребления кислорода (20% от всего организма), высокого уровня железа, которое может действовать как прооксидант при патологических состояниях [3]. Клинические исследования показали повышенный сывороточный уровень маркеров окислительного стресса даже спустя несколько месяцев после МИ, в основном, за счет изменения в сыворотке крови уровня антиоксидантов, вследствие чего существенно возрастает риск новых эпизодов ишемии [4]. Таким образом, окислительный стресс вызывает не только прямое и необратимое окислительное повреждение макромолекул, но также нарушает ключевые процессы редокс-зависимой сигнализации в артериальной стенке, и его влияние на церебральные сосуды в конечном итоге влияет на мозговое кровообращение.

Целью настоящей работы стал молекулярный и эпигенетический анализ вовлеченности генов антиоксидантной системы в формирование предрасположенности к развитию мозгового инсульта.

Материалом для исследования послужила выборка неродственных, русских индивидов, проживающих в Курской области, общей численностью 852 человека. В исследование вошли 378 пациентов с МИ (217 мужчин, 161 женщина), которые находились на стационарном лечении в Региональном сосудистом центре Курской областной клинической больницы и в неврологическом отделении Курской Городской клинической больницы скорой медицинской помощи в период 2011-2017 гг [5-7]. Группу сравнения составили 474 практически здоровых добровольцев (263 мужчины, 211 женщин) без хронических заболеваний в анамнезе и имеющих нормальный уровень артериального давления. Исследуемые группы (больных МИ и контроля) были сопоставимы по полу ($P > 0,05$). Средний возраст больных МИ составил 60 лет; средний возраст индивидов контрольной группы составил 59 лет ($P > 0,05$). Диагноз мозгового инсульта устанавливался в острейшей и острой фазах заболевания на основании результатов неврологического обследования и компьютерной томографии и/или магнитно-резонансной томографии головного мозга. Пациенты с печеночной и почечной недостаточностью, эндокринными, аутоиммунными, онкологическими и другими заболеваниями, которые могли вызвать острое нарушение мозгового кровообращения, были исключены из исследования. Из исследования также были исключены пациенты с вторичным внутримозговым кровоизлиянием, пациенты с гемодинамическим, гемореологическим и диссекционным типом инсульта, а также пациенты с черепно-мозговой травмой. Все пациенты с МИ имели в анамнезе артериальную гипертензию и получали гипотензивную терапию. Исследование было утверждено Региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета. Все участники дали письменное информированное согласие на включение в исследование. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов rs2070424 *SOD1*, rs4880 *SOD2*, rs769214 *CAT*, rs713041 *GPX4*, rs1128446 *TXNRD1*, rs17522918 *PRDX1*, rs41303970 *GCLM*, rs17883901 *GCLC*, rs854560 и rs662 *PON1*, rs7493 *PON2*, rs1695 *GSTP1*, rs2266782 *FMO3*, rs1800566 *NQO1* проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan зондов на амплификаторе CFX96, Bio-Rad (США); генотипирование делеционных полиморфизмов +/0 *GSTM1*, +/0 *GSTT1* проводили методом мультиплексной ПЦР. Для анализа ассоциаций генотипов с МИ использовали лог-аддитивную регрессионную модель с поправками на пол и возраст, рассчитанную в программе SNPStats. Значение $P \leq 0,05$ принималось как статистически значимое.

Статус метилирования был оценен на 113 образцах ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови 31 больного МИ и 82 здоровых индивидов. Бисульфитную модификацию ДНК проводили с использованием коммерческого набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Для оценки статуса метилирования были отобраны гены *TXNRD1* (3 сайта), *GSTP1* (2 сайта), *GCLM* (4 сайта). Степень метилирования оценивали методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 (Qiagen). Для сравнения уровня метилирования CpG-сайтов использовали U-критерий Манна-Уитни в программе SPSS Statistics v23.

С развитием МИ ассоциировались 3 SNP: rs1128446 *TXNRD1* (OR=1,93;95%CI=1,51-2,47); rs7493 *PON2* (OR=1,80;95%CI=1,46-2,22); rs2266782 *FMO3* (OR=1,24;95%CI=1,02-1,50) (Таблица 1).

Таблица 1. Результаты анализа ассоциаций исследованных SNP с развитием МИ.

Ген	rs	Результаты анализа ассоциаций генотипов (аддитивная модель)	
		corOR (95% CI)*	corP **
<i>SOD1</i>	rs2070424	1.01 (0.70-1.45)	0,97
<i>SOD2</i>	rs4880	1.04 (0.86-1.27)	0,67
<i>CAT</i>	rs769214	0.87 (0.71-1.07)	0,18
<i>GPX4</i>	rs713041	0.99 (0.81-1.20)	0,9
<i>TXNRD1</i>	rs1128446	1.89 (1.48-2.43)	<0.0001
<i>PRDX1</i>	rs17522918	0.87 (0.61-1.25)	0,45
<i>GCLM</i>	rs41303970	1.19 (0.95-1.49)	0,13
<i>GCLC</i>	rs17883901	1.10 (0.79-1.54)	0,58
<i>PON1</i>	rs854560	0.85 (0.69-1.05)	0,12
<i>PON1</i>	rs662	1.20 (0.96-1.50)	0,11
<i>PON2</i>	rs7493	1.79 (1.45-2.21)	<0.0001
<i>GSTM1</i>	+0 (-)	1.07 (0.81-1.42)	0,64
<i>GSTT1</i>	+0 (-)	1.20 (0.87-1.66)	0,26
<i>GSTP1</i>	rs1695	1.09 (0.89-1.34)	0,41
<i>NQO1</i>	rs2266782	0.97 (0.77-1.23)	0,81
<i>FMO3</i>	rs1800566	1.24 (1.02-1.51)	0,027
* – отношение шансов и 95%-доверительный интервал с коррекцией на пол и возраст;			
**- значение P для регрессионной модели с коррекцией на пол и возраст			

У пациентов с МИ наблюдалось снижение метилирования гена *GSTP1* (среднего по исследованному региону показателя: 2,7 [2,3; 3,9]%) по сравнению с контрольной группой (4,4 [3,6; 7,1]%; $P=9,43 \times 10^{-6}$). Также у больных МИ отмечалось снижение метилирования гена *GCLM* (среднего по исследованному региону показателя: 5,8 [4,1; 7,1]%) по сравнению с контрольной группой (7,9 [5,3; 10,3]%; $P=0,004$). Сравнительный анализ уровня метилирования *TXNRD1* различий между больными МИ и здоровыми индивидуумами не выявил.

Таким образом, гены антиоксидантной системы играют важную роль в предрасположенности к развитию цереброваскулярных заболеваний, как посредством ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов, так и посредством эпигенетических модификаций, связанных с изменением метилирования ДНК.

Литература

1. Mendis S., Davis S., Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease //Stroke. 2015. V. 46. №. 5. P. e121-e122.
2. Yang Q. et al. Potential neuroprotective treatment of stroke: targeting excitotoxicity, oxidative stress, and inflammation //Frontiers in Neuroscience. 2019. V. 13. P. 1036.
3. Saeed S. A. et al. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke //Experimental brain research. 2007. V. 182. №. 1. P. 1.
4. Alexandrova M. L., Bochev P. G. Oxidative stress in stroke //Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. 2007. V. 1. P. 313-368.
5. Bushueva O. Y., Stetskaya T. A., Korogodina T. V., Ivanov V. P., Polonikov A. V. The combined effect of E298D polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking on the risk of cerebral stroke //Genetika. 2015. V. 51. №. 2. P. 256-262.
6. Bushueva O.Y., Stetskaya T.A., Korogodina T.V., Ivanov V.P., Polonikov A.V. Investigation of the association between the HindIII polymorphism of the LPL gene and the Taq1b polymorphism of the CETP gene with the risk of atherothrombotic stroke in the dwellers of Central Russia //Therapeutic archive. 2015. V. 87. №. 8. P. 86-91.
7. Polonikov A., Vialykh E., Vasil'eva O., Bulgakova I., Bushueva O., Illig T., Solodilova M. Genetic variation in glutathione S-transferase genes and risk of nonfatal cerebral stroke in patients suffering from essential hypertension //Journal of Molecular Neuroscience. 2012. V. 47. №. 3. P. 511-513.

The role of antioxidant-related genes in predisposition to the development of cerebrovascular diseases: analysis of associations of single nucleotide polymorphisms and DNA methylation

O.Yu. Bushueva^{1*}, E.M. Barysheva¹, A.V. Markov², Yu.A. Koroleva², E.O. Churkin², M.S. Nazarenko², A.V. Polonikov¹, V.P. Ivanov¹

¹*Kursk State Medical University
3 K. Marx Street, 3305041 Kursk, Russia.*

²*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
10 Nab. r. Ushaiki, 634050 Tomsk, Russia.*

*Email: olga.bushueva@inbox.ru

In 378 patients with cerebral stroke (CS) and 474 healthy individuals, the analysis of associations of 16 SNP of the antioxidant-related genes with the risk of CS were assessed.

SNP rs1128446 *TXNRD1* (OR=1.93; 95%CI=1.51-2.47); rs7493 *PON2* (OR=1.80; 95%CI=1.46-2.22); rs2266782 *FMO3* (OR=1.24; 95%CI=1.02-1.50) were associated with an increased risk of CS. Analysis of methylation of antioxidant-related genes *TXNRD1*, *GCLM*, *GSTP1* revealed a decrease in *GSTP1* methylation in patients with CS (average for the studied region: 2.7 [2.3; 3.9]%) compared with the control group (4.4 [3.6 ; 7.1]%; $P=9.43 \times 10^{-6}$). In patients with CS we also observed a decrease in methylation of the *GCLM* gene (average for the studied region: 5.8 [4.1; 7.1]%) compared with the control group (7.9 [5.3; 10.3]%; $P=0.004$).

Keywords: cerebral stroke, oxidative stress, single nucleotide polymorphism, DNA methylation.

Динамика активности экспрессии генов серотонинергической, глутаматергической системы и генов нейропластичного пути в разных моделях хронического стресса

© Е.В. Валеева^{1,2*}, О.А. Кравцова¹

¹Казанский федеральный университет
Россия, 420008, Кремлевская, 18

²Казанский государственный медицинский университет
Россия, 420012, Бутлерова, 49

*E-mail: vevaleeva@ya.ru

Одной из проблем хронического стресса является нарушение регуляции нейротрансмиттерных систем и атрофии нейронов в связи с потерей синаптических связей. В работе представлены результаты изменения относительного уровня экспрессии генов в крови некоторых нейротрансмиттерных систем и генов, участвующих в нейропластичности, на вивальной модели крыс линии Вистар при воздействии хронического стресса в условиях иммобилизации и изнурительной физической нагрузки. Показано изменение транскрипционной активности *Slc6a4*, *Creb1* и *Adra2c* под влиянием хронического стресса в разный период воздействия.

Ключевые слова: хронический стресс, серотонинергическая система, глутаматергическая система, экспрессия генов.

Любой стресс является адаптивным ответом организма (аллостазом), контролируемым несколькими системами, в основном вегетативной нервной системой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой [1-3]. Однако при сверхнагрузке данных систем возникают ряд проблем у организма.

Хронический стресс – это длительное воздействие экстремальных факторов (стрессоров) на организм, вызывающий дисгомеостаз. Хронический стресс приводит к характерным нарушениям со стороны нервной и эндокринной системы, вызывая такие патологии как депрессия, истощение, и ускоряет дегенеративное старение [4].

Нейротрансмиттерные системы играют ключевую роль в регуляции ответа организма при стрессе. Серотонин вовлечен в патогенез развития различных психических расстройств таких, как депрессия, тревожные расстройства, шизофрения. Так, у пациентов с паническими расстройствами уровень серотонина 4-хкратно увеличен по сравнению со здоровой выборкой [5]. При стрессе также наблюдается изменение активности передачи и высвобождение другого нейротрансмиттера - глутамата в зависимости от активации кортикостерона [6]. У людей, страдающих депрессией, показано, что уровень глутамата также был повышен [7]. Помимо нарушений, происходящих в серотонинергической и глутаматергической системе, наблюдаются изменения во внутриклеточной передаче сигналов, нейротрофических механизмов, нейрогенезе и синаптической пластичности [8]. Показано, что ответ на стресс будет зависеть от индивидуальных генетических различий, стрессоустойчивости, от типа и степени стресса, а также продолжительности воздействия.

В связи с этим **целью** данной работы являлось оценить влияние хронического стресса в условиях иммобилизации и изнурительных физических нагрузок на изменение экспрессии относительного уровня генов серотонинергической (*Slc6a4*, *Htr4*), гена глутаматергической системы (*Adra2c*) и генов, участвующих в нейропластичности (*Creb1*, *Bdnf*) в крови у крыс линии Вистар.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 88 крысах Wistar (34 самок, 54 самцов) возрастом 90 дней. Эксперименты были одобрены Локальным этическим комитетом К(П)ФУ (протокол №20 от 27 декабря 2019 г.).

Моделирование хронического стресса проводили в условиях иммобилизации, изнурительной физической нагрузки и их комбинированного воздействия. В связи с этим были сформированы 4 группы крыс: I – контрольная (n=21); II – крысы, подвергавшиеся физической нагрузке в тесте «Вынужденное плавание с грузом» (ФН, n=22); III – животные, подвергавшиеся хроническому иммобилизационному стрессу (ИС, n=19); IV группа – животные, которые подвергались комплексной комбинации тестов из II и III группы (ФН+ИС, n=26).

Проведение теста «Вынужденное плавание с грузом» проходило 7 минут в специальном водном бассейне (НПК «Открытая наука», Красногорск) 2 раза в неделю в течение 270 сут. Груз, подвешиваемый вокруг брюшины шнурком, весил 8% от веса тела [9]. Хронический иммобилизационный стресс у крыс вызывался ежедневной 90-минутной иммобилизацией на протяжении 14 суток каждые 90 дней в специальном пенал-фиксаторе (НПК «Открытая наука», Красногорск) [10]. Опытную IV группу крыс подвергали комбинированному воздействию стрессоров II и III группы.

Забор крови из хвостовой вены крыс производили в начальной точке (0 сут) до воздействия стрессом, после 90-а, 180-и и 270-и сут исследования. Выделение суммарной РНК осуществляли реагентом ExtractRNA (Евроген, Москва) с последующим синтезом кДНК с помощью набора MMLV RT kit (Евроген, Москва). Анализ относительного уровня экспрессии генов *Slc6a4*, *Htr4*, *Adra2c*, *Creb1*, *Bdnf* был проведён количественной ПЦР в реальном времени с использованием собственно сконструированных праймеров [11] и мастер микса с интеркалирующим красителем Sybr Green [Евроген, Москва]. Референсным геном являлся *Gapdh*. Расчет относительного уровня экспрессии генов был проведен с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [12].

Результаты. В ходе анализа относительного уровня экспрессии гена *Slc6a4*, кодирующего транспортер серотонина, было обнаружено, что экспрессия *Slc6a4* на 90 сут повышалась в 2 раза у крыс, подвергавшиеся комбинированному воздействию стрессовых факторов (ФН+ИС) ($p=0,04$). На 180 сут эксперимента уровень экспрессии гена *Slc6a4* значительно повышался во всех опытных и контрольной группе: у контроля повышался в 6 раз ($p=0,0002$), в группе ФН в 29 раз ($p=0,003$), в группе ИС в 98 раз ($p=3,4*10^{-18}$) и в группе ФН+ИС в 49 раз ($p=6,7*10^{-11}$). При дальнейшем анализе уровня экспрессии *Slc6a4* на 180-е сут исследования между группами наблюдалось статистически значимое различие: уровень экспрессии *Slc6a4* у крыс в условиях иммобилизационного стресса были выше значений контроля ($p=3,1*10^{-8}$), ФН ($p=0,04$) и ФН+ИС ($p=0,001$) (Рисунок 1).

При анализе относительного уровня экспрессии гена *Htr4*, который кодирует рецептор серотонина, значимых изменений в динамике и между испытываемыми группами в каждом периоде не было обнаружено у испытываемых групп ($p>0,05$).

Сравнительный анализ опытных групп с начальной точкой показал, что на 180-е сут относительный уровень экспрессии *Adra2c* гена, кодирующего альфа адренорецептор 2С, в группе ИС было повышено в 2 раза ($p=0,03$) (Рисунок 1). Между опытными груп-

пами значимой разницы уровня экспрессии гена *Adra2c* в крови не было обнаружено в каждом периоде наблюдений ($p>0,05$).

При сравнительной оценке значения относительного уровня гена *Bdnf* (нейротрофического фактора мозга) не было обнаружено значимых изменений в исследуемые периоды и воздействия изучаемых стрессоров ($p>0,05$). На 90-е сут у крыс, подвергавшиеся воздействию ИС, уровень экспрессии гена *Bdnf* был ниже контрольной ($p=0,02$). На 180-е сут исследования, наоборот, в группе ИС уровень экспрессии гена значимо повышался контрольной группы и группы ФН этого же периода ($p=0,001$ и $p=0,002$, соответственно) (Рисунок 1).

Анализ транскрипционной активности гена *Creb1* на 180 сут снижался значимо во всех опытных группах ($p<0,05$). На 180-е сут уровень экспрессии *Creb1* был значимо ниже в группе крыс, подвергавшиеся ИС, по сравнению с контролем ($p=0,0004$) и группой, подвергавшиеся ФН ($p=0,02$). Так же в данном периоде наблюдалось снижение экспрессии *Creb1* в группе ФН+ИС по сравнению с контролем ($p=0,02$). На 270-е сут эксперимента уровень экспрессии гена *Creb1* был ниже в крови у крыс в группе ФН+ИС по сравнению с крысами из контрольной группы ($p=0,04$) (Рисунок 1).

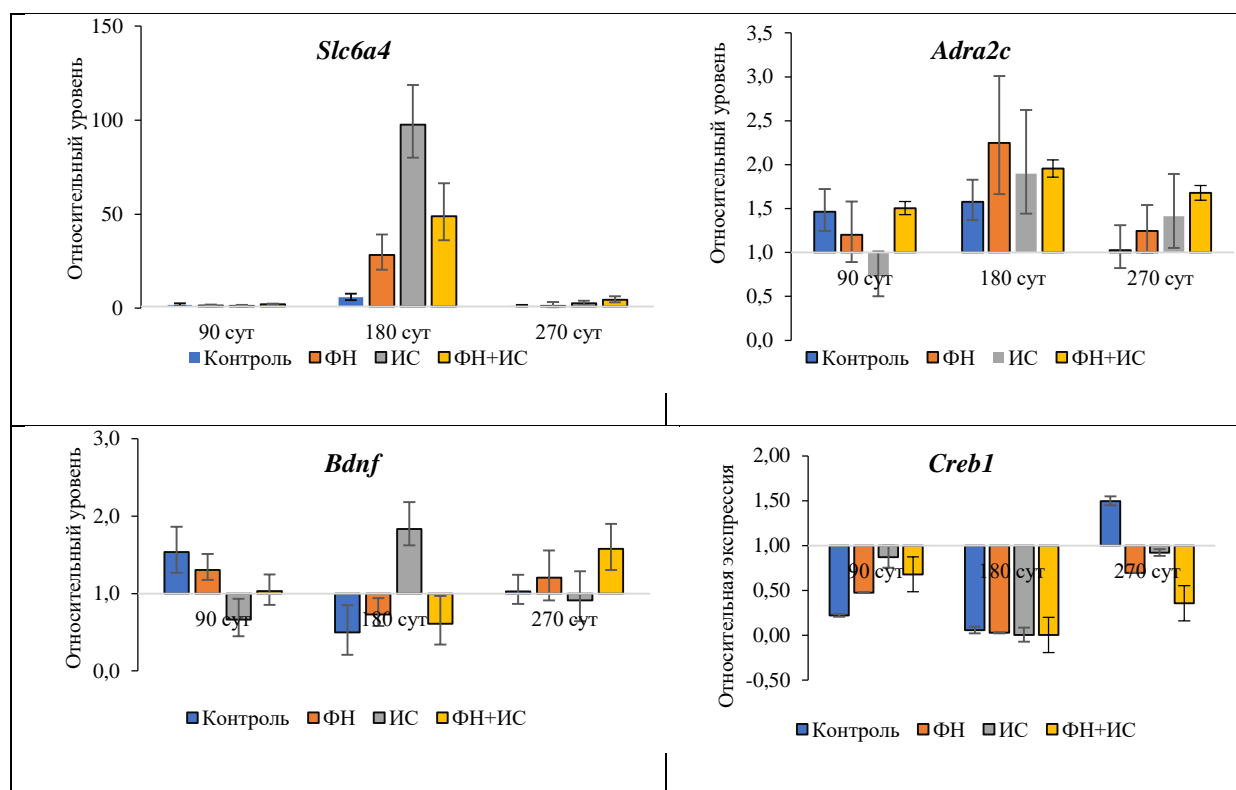


Рисунок 1. Динамика относительного уровня экспрессии генов *Slc6a4*, *Adra2c*, *Bdnf* и *Creb1* в крови различных моделей хронического стресса.

Примечание: ФН – физическая нагрузка, ИС – иммобилизационный стресс.

Выводы. Таким образом, в ходе анализа изменения относительного уровня генов серотонинергической, глутаматергической и генов, участвующих в нейропластичности, было обнаружено, что транскрипционная активность *Slc6a4*, *Creb1* и *Adra2c* изменяется под влиянием хронического стресса в разный период воздействия. Профиль экспрессии генов *Slc6a4* и *Creb1* обладают высокой степенью чувствительности к воздействию хронического стресса в условиях иммобилизации, изнурительной физической нагрузки и их комбинированного воздействия на 180 сут, а в условиях иммобилизации

онного стресса на 180 сут подходящим маркером хронического стресса может служить повышенный уровень экспрессии *Adra2c*.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-34-90171.

Литература

1. Harvey S., Phillips J. G., Rees A., Hall T. R. Stress and adrenal function //Journal of Experimental Zoology. 1984. V. 232. № 3. P. 633-645.
2. Collip J.B. Inhibitory hormones and the principle of inverse response //Annals of Internal Medicine.1934. V. 8. № 1. P. 10-13.
3. Sterling P., Eyer J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology// Life Stress, Cognition and Health. // John Wiley & Sons. 1988. P. 629-649.
4. McEwen B.S. Redefining neuroendocrinology: epigenetics of brain-body communication over the life course // Front. Neuroendocrinol. 2017. V. 49. P. 8-30.
5. Esler M., Lambert E., Alvarenga M., Socratous F., Richards J., Esler M., Lambert E., Alvarenga M., Socratous F., Richards J., Barton D., Pier C., Brenchley C., Dawood T., Hastings J., Guo L., Haikerwal D., Kaye D., Jennings G, Kalff V., Kelly M., Wiesner G., Lambert G. Increased brain serotonin turnover in panic disorder patients in the absence of a panic attack: reduction by a selective serotonin reuptake inhibitor //Stress. 2007. V. 10. № 3. P. 295-304.
6. Gorman J.M., Docherty J.P. A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders // J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 2010. V.22. P. 256-264.
7. Duman R.S. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections// Dialogues Clin. Neurosci. 2014. V. 16. № 1. P. 11-27.
8. Musazzi L., Treccani G., Mallei A., Popoli M. The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors // Biol Psychiatry. 2013. V. 73. P.1180-1188.
9. Beaton J.R., Feleki V. Effect of diet and water temperature on exhaustion time of swimming rats // Canadian journal of physiology and pharmacology. 1967. V. 45. № 2. P. 360-363.
10. Bhatia N., Jaggi A.S., Singh N., Anand P., Dhawan R. Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis // Journal of natural medicines. 2011. V. 65. P. 532-543.
11. BLAST (2021): [сайт]. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402-408.

Dynamics of the expression activity of genes of the serotonergic, glutamatergic systems and genes of the neuroplastic pathway in different models of chronic stress

E.V. Valeeva^{1,2*}, O.A. Kravcova¹

¹Kazan Federal University, Russia, 420008, Kremlevskaya str., 18

² Kazan State Medical University, Russia, 420012, Butlerova str., 49

*E-mail: vevaleeva@ya.ru

One of the problems of chronic stress is the dysregulation of neurotransmitter systems and neuronal atrophy due to the loss of synaptic connections. The study presents the results of changes in the relative level of gene expression of some neurotransmitter systems and genes involved in neuroplasticity in a vival model of Wistar rats under the influence of chronic stress under conditions of immobilization and exhausting physical activity. It was shown that the transcriptional activity of *Slc6a4*, *Creb1* and *Adra2c* changes under the influence of chronic stress in different periods of exposure.

Key words: chronic stress, serotonergic system, glutamatergic system, gene expression.

Генетический анализ хлебопекарных качеств мягкой пшеницы

© А.А. Галимова^{1*}, Е.А. Заикина¹, Н.И. Лещенко², И.Д. Кузнецов³, Б.Р. Кулуев¹

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054, г. Уфа, Проспект Октября, д. 71, лит. 1Е.

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450059, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 19

³Башкирский государственный аграрный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34

*Email: aiz.galimova@yandex.ru

Хлебопекарные качества мягкой пшеницы тесно связаны с белковым составом зерна, который впоследствии определяет качество клейковины. В работе представлены результаты по выявлению аллелей генов высокомолекулярных глютеинов *Glu-1* 26 озимых сортов и линий *Triticum aestivum* L., районированных к условиям Предуральской степной зоны. Исследуемые образцы имели различия генотипов по субгенам А и D, тогда как по субгену В в локусе х типа все сортообразцы имели одинаковые аллели.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, мягкая пшеница, хлебопекарные качества, высокомолекулярные глютеины, гены глютеинов *Glu-1*

Качество клейковины является одним из основных составляющих при формировании высоких хлебопекарных качеств мягкой пшеницы. Клейковина образуется при участии двух типов белков – глиадинов и глютеинов [1]. Белки глиадины представляют собой простые, мономерные, низкомолекулярные белки, растворимы в спирте; глютеины являются высокомолекулярными белками с массой до нескольких десятков миллионов дальтон и не растворимы в спирте [2]. При этом глютеины классифицируются на высокомолекулярные (HMW, high molecular weight) и низкомолекулярные (LMW, low molecular weight) [3]. Различия в молекулярных массах глиадинов и глютеинов обусловлены тем, что дисульфидные связи между остатками цистеина в глиадинах образуются в пределах одной молекулы, а в глютеинах – между разными молекулами. Основной каркас клейковины формируется за счет межмолекулярных дисульфидных связей между молекулами глютеинов, и, как результат, структура хлебобулочных изделий обеспечивается дисульфидными связями молекул глютеинов. Таким образом, субъединицы высокомолекулярного глютеина являются важными определяющими факторами качества пшеничного теста, поскольку они придают вязкоупругие свойства тесту, необходимому для замеса и выпечки. Обладая этой важной ролью, аллели генов высокомолекулярных глютеинов являются ключевыми маркерами в программах селекции. Гены глютеинов располагаются на хромосомах первой гомеологической группы. При этом гены высокомолекулярных глютеинов обозначаются как *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*), а гены низкомолекулярных как *Glu-3* (*Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*) [4]. Локусы высокомолекулярных субъединиц глютеинов кодируют полипептиды, образующие основную структуру клейковины за счет межмолекулярных дисульфидных связей. Для генов глютеинов характерны аллели, определяющие высокие и низкие показатели продуктивности, качества зерна, адаптивного потенциала [5].

В настоящей работе определены аллельные состояния локусов высокомолекулярных глютеинов *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1* у 26 озимых сортов и линий мягкой пшеницы, районированных к условиям Предуральской степной зоны. Для этого амплификацию локусов *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1* проводили с использованием праймеров UMN19 F/UMN19 R, Vx F/Vx R и UMN25 F/UMN25 R, UMN26 F/UMN26 R соответственно [6, 7]. Размеры ожидаемых ампликонов для праймеров UMN19 F/UMN19 R к субгену А составляли 362 п.о. для аллелей *a* или *c* и 344 п.о. для аллеля *b*. Аллель *a* обуславливает наработку субъединицы 1, аллель *b* – субъединицы 2* и аллель *c* – субъединицы null. Субъединицы 1 и 2* оказывают положительное влияние на качество теста, субъединица null — отрицательное. Посредством ПЦР-амплификации выявлено, что из числа исследуемых 5 образцов аллель *b* несут сорта Волжская качественная, Московская 39, Новоершовская и линии лютеценс 65752, лютеценс 67750, остальные исследуемые сортообразцы несут аллель *a* или *c* гена *Glu-A1* (табл. 1). Анализ состава глютеинов, обусловленных субгеномом В, проводили с помощью маркера Vx7. Функциональная значимость этого маркера была оценена путем измерения основных свойств теста 156 линий пшеницы. Butow и др. [6] была показана сильная связь между линиями с избыточной экспрессией Vx7 и высокой прочностью теста. Генотипирование исследуемых сортообразцов посредством праймеров Vx F/Vx R выявило отсутствие различий по локусу *x* типа субгена В — все исследуемые сорта и линии озимой мягкой пшеницы несут аллель, обуславливающий наработку субъединицы Vx7. Анализ генома D проводили с использованием праймеров к дуплексной ПЦР для одновременного выявления аллелей генов, кодирующих субъединицы Dx5 и Dy10 (5+10) и Dx2 и Dy12 (2+12). При использовании данных праймеров для образцов с субъединицами 5+10 наблюдали наличие ампликонов 397 и 281 п.о. (аллель *d*), с субъединицами 2+12 – ампликонов 415 и 299 п.о. (аллель *a*). Известно, что аллель *d* локуса *Glu-D1* (при наличии которого синтезируются субъединицы 5 и 10) имеет выраженное положительное влияние на качество муки. Тогда как распространенный аллель *a* (субъединицы 2 и 12) оказывает негативное влияние на получение качественного формового хлеба, однако рекомендуется для сортов, которые используются для изготовления подового хлеба, лапши и кондитерских изделий. В ходе настоящей работы выявлено, что из всей совокупности исследуемых сортообразцов 2 линии (лютеценс 65752 и лютеценс 67750) имеют аллель *a*, остальные несут аллель *d* (табл. 1).

В настоящее время доказано существование тесной корреляционной зависимости между присутствием/отсутствием определенных аллелей локусов *Glu-1* и показателями хлебопекарного качества. Известно, что сильное влияние на качество муки пшеницы оказывают аллели локуса *Glu-D1*. Следующими по влиянию являются аллели локусов *Glu-B1* и *Glu-A1* [8]. Аллельные варианты высокомолекулярных глютеинов 1A1, 1A2*, 1B 7+8, 1B 77+8, 1D 5+10 определяют высокие показатели качества зерна и хлебопекарных свойств пшеницы [7].

Таблица 1. Распределение аллелей генов *Glu-1* в сортах и линиях мягкой пшеницы Предуральской степной зоны.

№	Сорт/линия	Аллели гена <i>Glu-1</i>		
		Субгеном А <i>Glu-A1</i>	Субгеном В <i>Glu-B1</i>	Субгеном D <i>Glu-D1</i>
1	Агидель	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
2	Агидель Н	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
3	Агидель 2	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
4	Алабасская	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
5	Анастасия	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
6	Аэлита	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>

7	Башкирская 10	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
8	Безенчукская 380	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
9	Волжская качеств.	<i>b</i>	Vx7	<i>d</i>
10	Калач 60	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
11	Лана	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
12	Московская 39	<i>b</i>	Vx7	<i>d</i>
13	Новоершовская	<i>b</i>	Vx7	<i>d</i>
14	Уфимка	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
15	Лютесценс 25520	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
16	Лютесценс 47488	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
17	Лютесценс 60865	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
18	Лютесценс 65532	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
19	Лютесценс 65737	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
20	Лютесценс 65752	<i>b</i>	Vx7	<i>a</i>
21	Лютесценс 67750	<i>b</i>	Vx7	<i>a</i>
22	Эритроспермум 37067	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
23	Лютесценс 68347	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
24	Лютесценс 68551	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
25	Эритроспермум 69577	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>
26	Эритроспермум 70757	<i>a/c</i>	Vx7	<i>d</i>

Таким образом, в ходе молекулярно-генетического анализа сортов и линий озимой мягкой пшеницы, районированных к условиям Предуральской степной зоны, был исследован полиморфизм сортообразцов по генам высокомолекулярных глютеинов *Glu-1* посредством ПЦР-амплификации и визуализации результатов по конечной точке. Среди 26 изученных сортов и линий озимых форм *T. aestivum* выявлены различия по геномам А и D. Преобладающее большинство исследуемых сортов и линий имели генотипы с аллелями *a/c*, Vx7, *d* для геномов А, В и D соответственно (для субгенома В указана съединица глютеина. Установление достоверного аллеля требует дополнительных исследований). У 3 сортов выявлены аллели *b* в геноме А (по геномам В и D так же несут аллели Vx7, *d*): Волжская качественная, Московская 39, Новоершовская. Наконец, у двух линий (лютесценс 65752 и лютесценс 67750) выявлены аллели *b* генома А и аллель *a* генома D, которые являются редкими для исследуемой группы сортов и линий озимой мягкой пшеницы. Итак, по полученным результатам сочетание аллелей генов высокомолекулярных глютеинов *Glu-1* сортов Волжская качественная, Московская 39, Новоершовская представляется наиболее благоприятным для формирования высоких хлебопекарных качеств зерна.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119021190011-0.

Литература

1. Чеботарь С.В., Благодарова Е.М., Куракина Е.А. и др. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы // *Вагилевский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16. С. 87–98.
2. D'Ovidio R., Masci S. The low molecular weight glutenin subunits of wheat gluten // *J. Cereal Sci.* 2004. V. 39. P. 321–339.
3. Shewry P., Halford N. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization // *Journal of experimental botany*. 2002. V. 53. P. 947–958.

4. Zhang W., Gianibelli M., Rampling L. Characterisation and marker development for low-molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theoretical and Applied Genetics. 2004. V. 108. P. 1409–1419.
5. Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., др. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства // Цитология и генетика. 2000. Т. 34. С. 91–104.
6. Butow B.J., Ma W., Gale K.R., et al. Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength // Theoretical and Applied Genetics. 2003. V. 107. P. 1524–32.
7. Сичкарь С.М., Великожон Л.Г., Дубровная О.В. Молекулярно-генетический анализ и хлебопекарные качества гибридов *Triticum spelta* L. × *Triticum aestivum* L. // Молекулярная и прикладная генетика. 2017. Т. 22. С. 96–103.
8. Boisson M., Mondon K., Torney V. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat // Theoretical and Applied Genetics. 2005. V. 110. P. 932–940.

Genetic analysis of bread wheat baking qualities

A. A. Galimova^{1*}, E. A. Zaikina¹, N. I. Leshchenko², I. D. Kuznetsov³, B. R. Kuluev¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Bashkir Agriculture Research Institute UFRC RAS
19 Zorge street, 450059 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

³*Bashkir State Agrarian University
34 50-letiiia Octiabria street, 450059 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Email: aiz.galimova@yandex.ru

The baking qualities of bread wheat are closely related to the protein composition of the grain, which subsequently determines the quality of gluten. The work presents the results on the identification of high molecular weight glutenins *Glu-1* genes alleles of 26 winter varieties and lines of *Triticum aestivum* L., zoned to the conditions of the pre-Ural steppe zone. The studied samples had differences in genotypes for the A and D genomes, while for the x type locus on B genome all cultivars had the same alleles.

Keywords: *Triticum aestivum* L., bread wheat, baking quality, high molecular weight glutenins, glutenin genes *Glu-1*

Морфогенез *in vitro* в каллусах ячменя: влияние флуридона

© И.Р. Галин, О.А. Сельдимирова*

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октябряб 69

*E-mail: o_seldimirova@mail.ru

С использованием методов световой микроскопии и твердофазного иммуноферментного анализа изучено влияние ингибитора синтеза эндогенной АБК флуридона на морфогенез *in vitro* и содержание эндогенных АБК и ИУК в каллусах дефицитного по АБК мутанта ячменя AZ34 и его родительского сорта Steptoe. Установлено, что к 4-й неделе культивирования *in vitro* на среде с добавлением флуридона наблюдалось значительное повышение содержания ИУК на фоне снижения содержания АБК по сравнению с контролем. Изучено влияние флуридона на протекание путей морфогенеза *in vitro* в каллусах изучаемых генотипов. Сделан вывод о важной роли АБК в процессе эмбриоидогенеза *in vitro*.

Ключевые слова: ячмень, *Hordeum vulgare* L., культура *in vitro*, каллус, флуридон, АБК, ИУК.

Установлено, что фитогормональный фактор – ключевой при культивировании *in vitro* растительных тканей и органов, в том числе в каллусных культурах [17, 23, 25]. Один из путей морфогенеза *in vitro*, реализуемых в каллусах, – эмбриоидогенез – формирование зародышеподобных биполярных структур из клетки/групп клеток эмбриоидогенных каллусов в ответ на экзогенные и/или эндогенные сигналы [11, 14, 15].

В исследованиях эмбриоидогенеза *in vitro* большое внимание уделяется ауксинам и цитокининам, как основным регуляторам этого процесса [11, 13, 17, 23], в то время как участию АБК в регуляции эмбриоидогенеза *in vitro* уделяется гораздо меньше внимания. Основная масса работ направлена на изучение влияния экзогенной АБК на индукцию формирования и развития эмбриоидов *in vitro*. Эти работы главным образом посвящены исследованиям прямого эмбриоидогенеза *in vitro*, при котором эмбриоиды формируются непосредственно из клеток экспланта, минуя стадию каллуса. Полученные данные, как правило, достаточно противоречивы [обзоры: 4, 18]. Данные же об участии в эмбриоидогенезе *in vitro* эндогенной АБК малочисленны, и особенно это касается злаков [19, 21]. Кроме того, данные о взаимодействии АБК и ИУК, а также о влиянии ингибиторов синтеза АБК на процессы эмбриоидогенеза *in vitro* также единичны [8, 20, 24].

В связи с этим цель работы состояла в изучении влияния ингибитора синтеза эндогенной АБК – флуридона на морфогенез *in vitro*, в том числе эмбриоидогенез, и содержание эндогенных АБК и ИУК в каллусах ячменя.

Объектами исследования послужили ячмень сорта Steptoe и его АБК-дефицитный мутант AZ34. Каллусы получали из незрелых зародышей на 13–15 сутки после массового цветения, как описано [2]. Для культивирования использовали среду МС, дополненную 2.0 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л CuSO₄ × 12H₂O (контроль), Для изучения влияния ингибитора синтеза эндогенной АБК в вышеописанную среду добавляли 100 мг/л

флуридона [6]. Каллусы культивировали в течение 4 недель в темноте, при 26°C. Для индукции эмбриоидогенеза каллусы переносили на среду МС без добавления регуляторов роста. Для оценки содержания гормонов использовали каллусы через 1 и 4 недели культивирования *in vitro* на среде с регуляторами роста, для гистологического анализ – через 1 неделю культивирования *in vitro* на среде без регуляторов роста. Использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа в модификации [26] и методы световой микроскопии [3]. Препараты просматривали и документировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Jena, Германия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010.

После 1-й недели культивирования *in vitro* уровень АБК как у AZ34, так и у Steptoe был выше по сравнению с 4-й неделей *in vitro* на обоих вариантах питательных сред (рис. 1). Эти данные согласуются с полученными нами ранее результатами по содержанию эндогенной АБК в культивируемых *in vitro* каллусах пшеницы, в которых отмечалось значительное повышение содержания АБК в начале культивирования [5]. Это, по-видимому, можно объяснить тем, что введение в культуру *in vitro* экспланта само по себе является, по мнению Р.Г. Бутенко [1], стрессовым воздействием, которое, возможно, и ведет к повышению уровня эндогенной АБК.

Введение же флуридона в среду для культивирования вызывало почти двукратное по сравнению с контролем снижение уровня АБК в каллусах через 1-ю неделю культивирования *in vitro*, и почти трехкратное снижение к 4-й неделе по сравнению с 1-й. На фоне пониженного содержания АБК, в каллусах AZ34 наблюдалось повышенное, по сравнению со Steptoe, содержание ИУК как на среде без флуридона, так и на среде с его добавлением (рис. 1.). Особенно заметной эта разница была на 4-й неделе культивирования *in vitro*.

Пара АБК/ауксины зачастую рассматривается с точки зрения их антагонистического взаимодействия [7], которая подтверждается и полученными нами данными. Возможно, что повышение уровня ауксинов на фоне снижения содержания АБК в каллусе может быть следствием снижения способности АБК влиять на уровень ауксинов путем активации процесса их конъюгирования [16]. Кроме того, возможно и обратное влияние ИУК на уровень АБК в каллусе вследствие способности ауксинов влиять на метаболизм АБК [10]. Следует отметить, что влияние АБК на ауксины в условиях культуры *in vitro* может быть двойственным, поскольку показана способность этого гормона не только активировать конъюгирование ауксинов, но и стимулировать их синтез [16]. Вероятно, характер действия АБК на метаболизм ауксинов может меняться на разных стадиях культивирования *in vitro*.

Гистологический анализ показал, что в каллусах Steptoe на среде МС без флуридона наблюдалось образование поверхностной меристематической зоны, из клеток которой формировались зародышеподобные структуры – эмбриоиды, имеющие типичное для зародышей злаков строение (рис. 2а). В каллусах же AZ34 также отмечалось формирование поверхностной меристематической зоны и начиналось образование эмбриоидов с дифференцированными апикальной и базальной частями (рис. 2в). Однако дальнейшее развитие эмбриоидов у AZ34 задерживалось. При добавлении в среду флуридона у Steptoe наблюдалась задержка развития эмбриоидов на стадии становления апикально-базальной оси (рис. 2б), а в каллусах AZ34 инициировался только такой путь морфогенеза *in vitro*, как ризогенез (рис. 2г).

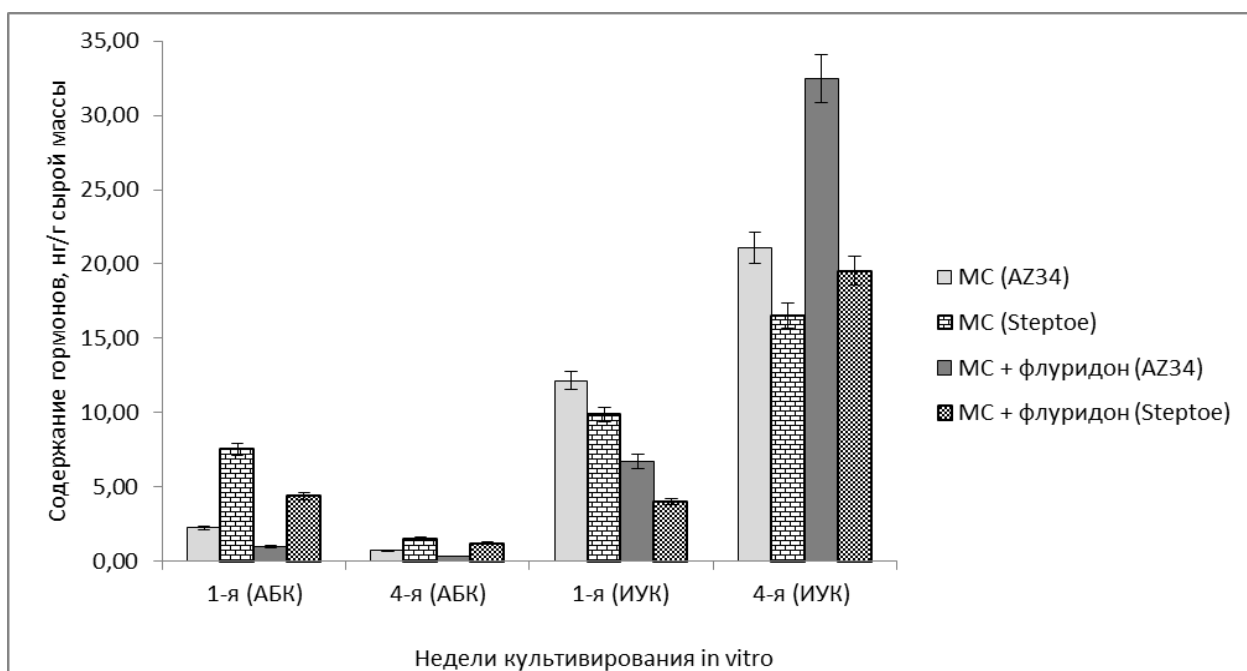


Рис. 1. Содержание эндогенных ИУК и АБК в каллусах ячменя через 1 и 4 недели культивирования *in vitro*, нг/г сырой массы

Хорошо известно, что именно ауксины играют важную роль в процессах роста и развития. Также известно, что для нормальной индукции и развития эмбриоидов *in vitro* необходимо снижение уровня эндогенных ауксинов [25], а также наличие адекватной концентрации эндогенной АБК [4, 18]. Возможно, что избыточное количество эндогенной ИУК и недостаточное количество эндогенной АБК и обуславливают в нашем случае задержку развития эмбриоидов в каллусах Stepoe, обработанных флуридоном.

В каллусах AZ34, обработанных флуридоном индукция эмбриоидогенеза *in vitro* полностью блокировалась и реализовывался такой путь морфогенеза *in vitro*, как ризогенез. Способность ауксинов индуцировать ризогенез в каллусных культурах *in vitro* хорошо изучена, начиная с работы Скуга и Миллера [22; см. также: 12, 27 и мн. др.]. Вполне закономерно, что повышенное содержание ИУК в каллусах AZ34 на фоне пониженного содержания АБК ведет к реализации такого пути, как ризогенез *in vitro*.

Таким образом, как генетически детерминированный низкий уровень АБК у AZ34, так и снижение содержания АБК под влиянием флуридона у обоих генотипов, а также вызванное этим повышение уровня ИУК приводило к блокировке или задержке развития эмбриоидов *in vitro* в каллусах ячменя.

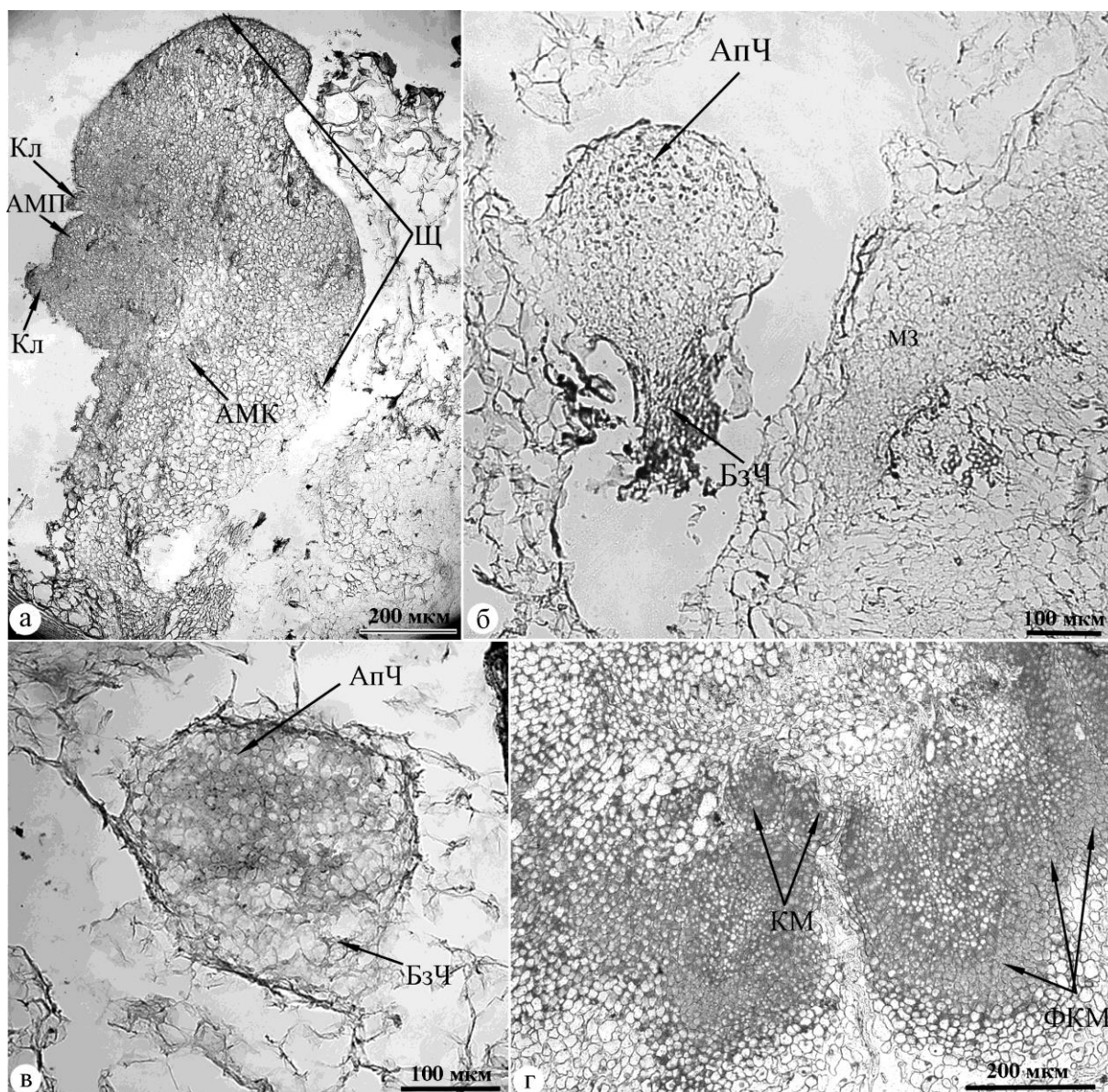


Рис. 2. Пути морфогенеза *in vitro* в каллусах ячменя сорта Steptoe (а, б) и АБК-дефицитного мутанта AZ34 (в, г) на среде МС (а, в) и среде МС, дополненной флуридоном (б, г): а – эмбриоид нормального строения на среде МС, б, в – задержка развития эмбриоида со сформированной апикально-базальной осью, г – ризогенез.

Полученные нами данные согласуются с результатами [9], показавшими полное блокирование развития эмбриоидов в каллусах древовидного папоротника *Cyathea delgadii* Sternb. в присутствии флуридона за счет отсутствия специфических паттернов делений клеток, необходимых для образования эмбриоидов. Похожие результаты были получены в работе [24], где опыты с применением флуридона показали, что АБК необходима не только для стимулирования созревания и нормального развития эмбриоидов, но также и для приобретения каллусами эмбриоидогенной компетентности.

По-видимому, полученные данные о положительной роли АБК совместно с другими гормонами в индукции и процессах соматического эмбриогенеза *in vitro* нужно рассценивать как проявление хорошо установленного взаимодействия в многокомпонент-

ной гормональной системе растений *in vivo* [обзор: 4]. Следует отметить, что вопрос совместного действия АБК и других веществ активно изучается, однако на уровне констатации эмпирических данных.

В то же время, способность фитогормонов влиять на концентрацию друг друга – одна из важных особенностей гормональной системы растений. Хотя эта закономерность не вызывает сомнений, имеющиеся данные о взаимодействии гормонов в процессе эмбриоидогенеза *in vitro* злаков весьма противоречивы и малочисленны, и для решения этого вопроса требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190099-6.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 152 с.
2. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: «Гилем», 2011. 124 с.
3. Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.
4. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // Известия Уфимского НЦ РАН. 2018б. № 2. С.55–60.
5. Сельдимирова О.А., Безрукова М.В., Галин И.Р., Лубянова А.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Влияние 24-эпибрассинолида на формирование, ростовые показатели и регенерационную способность каллусов *in vitro* контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 6. С. 461–472.
6. Сельдимирова О.А., Кудоярова Г.Р., Галин И.Р., Веселов Д.С., Круглова Н.Н. Влияние ингибиторов синтеза АБК и транспорта ауксинов на морфогенез в культуре *in vitro* и активность пероксидаз у дефицитного по АБК мутанта ячменя и его исходного генотипа // Биомика. 2019. Т.11. № 4. С. 386–393.
7. Du H., Wu N., Fu J., Wang S., Li X., Xiao J., Xiong L A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // J. of Exp. Bot. 2012. V. 63. № 18. P. 6467–6480.
8. Farias-Soares F.L., Steiner N., Schmidt E.C., Pereira M.L.T., Rogge-Renner G.D., Bouzon Z.L., Floh E.S.I., Guerra M.P. The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines // Acta Physiol. Plant. 2014. V. 36. № 7. P.1853–1865.
9. Grzyb M., Kalandyk F., Mikuła A. Effect of TIBA, furidone and salicylic acid on somatic embryogenesis and endogenous hormone and sugar contents in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. // Acta Physiol. Plant. 2018. V. 40. № 1:1.
10. Hansen H., Grossmann K. Auxin-Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition // Plant Physiol. 2000. V. 124. № 11. P. 1437–1448.
11. Joshi R., Kumar P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review // Agri. Reviews. 2013. V. 34. № 1. P. 1-20.

12. Ikeuchi M., Iwase A., Sugimoto K. Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation // *Current opinion in plant biology*. 2015. V. 28. № 9. P. 60–67.
13. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* / Eds Germana M.A., Lambardi M. New York: Humana Press, 2016. 558 p.
14. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* Morphogenesis Pathway in Cereals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. № 5. P. 245–249.
15. Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. Somatic Embryogenesis. An Overview // *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* / Eds Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. Springer, Cham, 2016. P. 1–8.
16. Park S.Y., Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., Zhao Y., Lumba S., Santiago J., Rodrigues A., Chow T.F., Alfred S.E., Bonetta D., Finkelstein R., Provart N.J., Desveaux D., Rodriguez P.L., McCourt P., Zhu J.K., Schroeder J.I., Volkman B.F., Cutler S.R. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins // *Science*. 2009. V. 324. № 5930. P. 1068–1071.
17. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* / Eds Bhojwani S.S., Dantu P.K. Springer India, 2013. P. 31–33.
18. Rai M.K., Shekhawat N.S., Harish, Gupta A.K., Phulwaria M., Ram K., Jaiswal U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2011. V. 106. № 2. P.
19. Reis R.S., Vale E.M., Sousa K.R, Santa-Catarina C., Silveira V. Pretreatment free of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of reserves // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2021. V. 145. № 1. P. 101–115.
20. Ruduś I., Weiler E., Kępczyńska E. Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis? // *Plant Growth Regul.* 2009. V. 59. № 2. P. 159–169.
21. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Galin I.R., Veselov D.S. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley Calli *in vitro* Is Determined by the Level of Indoleacetic and Abscisic Acids // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2019. V. 50. № 3. P. 124–135.
22. Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957. V. 11. P. 118–131.
23. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* / Eds Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. Cham: Springer, 2016. 506 p.
24. Su Y.H., Su Y.X., Liu Y.G., Zhang X.S. Abscisic acid is required for somatic embryo initiation through mediating spatial auxin response in *Arabidopsis* // *Plant Growth Regul.* 2013. V. 69. № 2. P. 167–176.
25. Tang L.P., Zhang X.S., Su U.H. Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis // *aBIOTECH*. 2020. V. 1. № 3. P. 185–193.
26. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Kudoyarova G.R. Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: its impact on the differential growth of roots and shoots // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. № 12. P.
27. Yu J., Liu W., Liu J., Qin P., Xu L. Auxin Control of Root Organogenesis from Callus in Tissue Culture // *Front. Plant Sci.* 2017. V.8: 1385.

Особенности биосинтеза фитостеролов пальмы ползучей и тыквы обыкновенной, как компонентов лекарственных средств

© Е.Е. Галкина, О.А. Воробьева

*Приволжский исследовательский медицинский университет
Россия, Нижегородская область, 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1*

Email: evgesha.gal@yandex.ru

Сравнительный качественный и количественный анализ фитостеролов тыквы большой и пальмы ползучей показал, что данные растения служат перспективным лекарственным растительным сырьём для включения в состав гиполипидемических препаратов.

Ключевые слова: фитостерол, биосинтез фитостеролов, пальма ползучая, тыква большая.

Фитостеролы – производные изопреноидов, которые являются структурным компонентом биологической мембраны растительной клетки. Стероиды являются предшественниками группы растительных гормонов, которые регулируют рост и развитие растений. Кроме того, стеролы участвуют в трансмембранной трансдукции сигналов, образуя липидные микродомены. [1,2]

Фитостеролы в растительной клетке находятся в свободном виде, образуют сложные эфиры с высшими жирными кислотами, гликозиды с растительными сахарами и ацил-стеролгликозиды. Это разнообразие структурных типов фитостеролов определяет широкий спектр их функций в жизни растений [1].

Наиболее известным отечественным источником фитостеролов являются семена тыквы большой. В Америке известно другое растение-эндемик, обогащенное фитостеролами – пальма ползучая.

Целью настоящей работы являлся сравнительный качественный и количественный анализ фитостеролов тыквы большой и пальмы ползучей на основе литературных данных, а также характеристика пути биосинтеза фитостеролов в составе растений.

Путь биосинтеза фитостеролов пальмы ползучей и тыквы большой представляет собой сложный многоступенчатый процесс, проходящий в эндоплазматическом ретикулуме растительной клетки. Данный процесс можно разделить на два основных этапа. Начальный этап в биосинтезе – это мевалонатный путь. Основным его продуктом превращения является изопентенилпирофосфат (ИПП). В дальнейшей реакции из ИПП образуется ключевой метаболит – сквален. [1,2]

Вторым этапом является циклизация сквалена до циклоартенола.

Важными ферментами биосинтеза стеролов растений являются 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА-редуктаза (ГМГ-КоА-редуктаза), метилтрансфераза стерола C24, десатураза стерола C22.

ГМГ-КоА-редуктаза. Ключевым ферментом изопреноидного пути в растениях, приводящим к синтезу различных стеролов и их производных, является ГМГ-КоА-редуктаза (HMGR). Она катализирует превращение 3-гидрокси-3-метилглутарилкоэнзима А в мевалоновую кислоту.

Метилтрансфераза стерола С24. Отличительной особенностью фитостеролов является наличие дополнительной метильной или этильной группы в положении С24 боковой цепи. Данная стадия катализируется SMT ферментом, или S - аденозил-L-метионинзависимая стерин-метилтрансфераза С24. SMT - необходимый фермент биосинтеза растительных стеролов, роль которого заключается в определении оптимального баланса молекулярных типов стеролов в растении в процессе онтогенеза.

Десатураза стерола С22. Десатураза стерола С22 – данный фермент осуществляет превращение β -ситостерол в стигмастерол. Протекание реакции возможно под действием молекулярного кислорода и НАДФН, а ингибиторами процесса служат СО и метирапоном. [1,2]

Качественный и количественный фитостерольный состав тыквы большой и пальмы ползучей представлен в таблице 1

Экстракт пальмы ползучей применяется для лечения хронического простатита. Также он обладает выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами.[8]

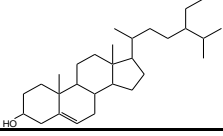
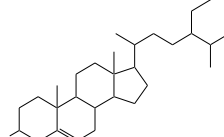
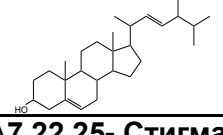
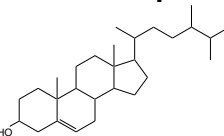
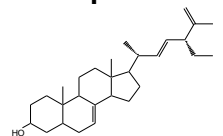
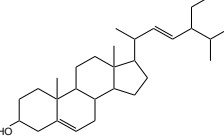
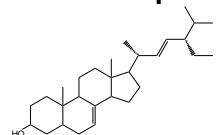
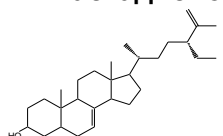
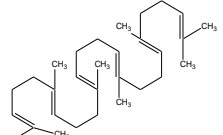
Экстракт семян тыквы богат маслами, аминокислотами, микроэлементами (марганец, калий, железо, фосфор), витаминами групп А, В, Е, D, РР. Он содержит стеролы, которые положительно влияют на половую систему у мужчин и нормализуют сексуальный тонус организма. Проявляет противовоспалительные, антиоксидантные, гиполипидемические эффекты. [8] . Кукурбитацин – специфический фитостерол тыквы – обладает противоязвенной активностью, а также известно его противоопухолевое действие, связанное с индукцией образования кофилин-актиновых палочек и агрегации актина, приводящих к нарушению клеточного цитокинеза. [3]

Также отмечены антиканцерогенные эффекты фитостеролов относительно рака толстой кишки, молочной железы и простаты, иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства [9]. Доказано, что фитостеролы ускоряют обращение сфингомиелина, образование церамидов, что ингибирует пролиферацию клеток и активирует апоптоз в неопластических клетках.

Клинические исследования [8] показали, что оба экстракта обладают антипролиферативным действием, однако, экстракт семян тыквы оказывает также противовоспалительный эффект, что, вероятно, связано не только с фитостерольным составом растения, но и с сопутствующими компонентами, такими как жирные кислоты, каротиноиды, хлорофиллы и др.

Отмечена способность фитостеролов подавлять абсорбцию холестерина, тем самым снижая уровень холестерина в крови. В основном это происходит за счет конкуренции в просвете кишечника, что было продемонстрировано в экспериментах на животных и людях. Следовательно, фитостеролы могут действовать как адъювант при профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Таблица 1. Сравнительная характеристика фитостерольного состава тыквы большой [3,4] и пальмы ползучей [5,6,7].

Фитостерольный состав тыквы большой		Фитостерольный состав пальмы ползучей	
Компонент	Содержание в выжимке семян от общего значения фитостеролов	Компонент	Содержание в пересчете сухой экстракт от общего значения фитостеролов
Бета-ситостерол 	41,1-53,6%	Бета-ситостерол 	68-72%
Стигмастерол 	12,5-20,3%	Кампестерол 	20-23%
Δ7.22.25- Стигматриенол 	18,8-31,1%	Стигмастерол 	8-9%
Спинастерол 	18,2-23,3%		
7,25-Стигмастидиенол 	5,8-8,0%		
Сквален 	0,5832-0,747%		

Научные данные свидетельствуют о том, что фитостеролы влияют на всасывание холестерина в просвете кишечника, поскольку их химическая структура схожа друг с другом. Таким образом, когда холестерин и фитостеролы одновременно присутствуют в просвете кишечника, они конкурируют за включение в структуру мицелл.

Бета-ситостерол, присутствующий в относительно большом количестве в обоих растениях, оказывает антиандрогенное и антиоксидантное действие. Именно он способен проявлять гипохолестеринемический эффект. Таким образом, тыква большая и пальма ползучая являются перспективным лекарственным растительным сырьём для включения в состав гиполипидемических препаратов.

Литература

1. J.N. Valitova, A.G. Sulkarnayeva, F.V. Minibayeva Plant Sterols: Diversity, Biosynthesis, and Physiological Functions // ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 2016, Vol. 81, No. 8, pp. 819-834 DOI:10.1134/S0006297916080046
2. Vieno Piironen, David G Lindsay, Tatu A Miettinen, Jari Toivo and Anna-Maija Lampi Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition // May 2000 Journal of the Science of Food and Agriculture 80(7):939 – 966 DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C
3. Rosa Martha Perez Gutierrez Review of Cucurbita pepo (Pumpkin) its Phytochemistry and Pharmacology // Perez Gutierrez, Med chem 2016, vol. 6, p. 12-21 // DOI: 10.4172/2161-0444.
4. European Medicines Agency Science Medicines Health (EMA/HMPC/136022/2010) Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) // Assessment report on Cucurbita pepo L., semen Based on Article 16d(1), Article 16f and Article 16h of Directive 2001/83/EC as amended (traditional use)
5. Penugonda K et al. Fatty Acid and Phytosterol Content of Commercial Saw Palmetto Supplements / Kavitha Penugonda and Brian L. Lindshield // Nutrients. 2013 Sep; 5(9): 3617–3633. DOI:10.3390/nu5093617
6. Michele M. Schantz, Mary Bedner, Stephen E. Long, John L. Molloy, Karen E. Murphy, Barbara J. Porter, Karsten Putzbach, Catherine A. Rimmer, Lane C. Sander, Katherine E. Sharpless, Jeanice B. Thomas, Stephen A. Wise, Laura J. Wood, James H. Yen, Takashi Yarita, Agnes NguyenPho, Wendy R. Sorenson, Joseph M. Betz Development of saw palmetto (*Serenoa repens*) fruit and extract standard reference materials // Anal Bioanal Chem (2008) 392:427–438 (опубликовано в 2008г.) DOI: 10.1007/s00216-008-2297-0
7. Stefania Giammarioli, Concetta Boniglia, Luigia Di Stasio, Raffaella Gargiulo, Maurizio Mosca & Brunella Carratù (2018): Phytosterols in supplements containing *Serenoa repens*: an example of variability of active principles in commercial plant based products, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2018.1490910
8. Кульченко, Н.Г. Фитотерапия при воспалительных заболеваниях предстательной железы/ И.Г. Кульченко, Е.В. Яценко// Исследования и практика в медицине. – 2019. – т.6, №3. - с 87-97
9. Tata Ch., Ndinteh D., Nkeh-Chungag B., Oyedeji O. et al. Fractionation and bioassay-guided isolation of antihypertensive components of *Senecio serratuloides* // Cogent Medicine. – 2020. – DOI: 10.1080/2331205X.2020.1716447.

Features of the biosynthesis of phytosterols of Saw palmetto and Cucurbita pepo as components of medicines

E. E. Galkina, O. A. Vorobyova

Privolzhsky Research Medical University

Russia, Nizhny Novgorod region, 603005, Nizhny Novgorod, Minin and Pozharsky pl., 10/1

Email:evgesha.gal@yandex.ru

A comparative qualitative and quantitative analysis of phytosterols of Saw palmetto and Cucurbita pepo showed that, these plants can be used like medicinal plant raw materials for inclusion in the composition of hypolipidemic drugs.

Key words: phytosterol, phytosterol biosynthesis, Saw palmetto, Cucurbita pepo

Кортизол как биомаркер черт темперамента подростков

© М.И. Гарипова, С.А. Башкатов, Л.М. Хабибуллина

Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32

Email: margaritag@list.ru

Нейрохимические биомаркеры черт темперамента различаются по своей природе и влиянию на поведение в разных возрастных группах. В статье рассматривается роль кортизола в формировании особенностей темперамента подростков.

Ключевые слова: биомаркеры черт темперамента, кортизол, расстройства пищевого поведения, нейротизм.

Наибольшее количество публикаций, посвященных эндокринным биомаркерам черт темперамента в подростковом возрасте посвящено исследованию концентрации кортизола. Кортизол – основной глюкокортикоид человеческого организма, отвечает за обеспечение мозга глюкозой. Концентрация кортизола в крови определяется временем суток и ситуацией, в том числе стрессом. Регуляция синтеза и секреции кортизола обеспечивается осью НРА и зависит от функционального состояния коры надпочечников. Секреция кортизола снижается при хроническом стрессе вследствие истощения коры надпочечников. Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что гипокортицизм сопровождается усилением таких черт характера, как невротизм и интроверсия. По данным Booij SH и соавторов, в этом случае наблюдается относительно более плоская кривая суточной концентрации кортизола [1]. Концентрации кортизола, определенные в момент пробуждения, согласно исследованиям S. Dockray, положительно коррелируют с таким свойством личности, как открытостью опыту [2]. Открытость опыту наряду с экстраверсией, доброжелательностью, добросовестностью и невротизмом входит в перечень личностных черт, входящих в состав «Большой пятерки» [3]. Ряд авторов приходит к выводу о повышенной активности оси НРА при депрессии, связанной с гиперкортизолемией [4]. По данным Booij SH и соавторов, более высокие концентрации кортизола связаны с более высокими уровнями избегания вреда и более низкими уровнями поиска новизны [4]. Таким образом, индивидуальные особенности подростка, эмоциональная лабильность или стабильность, оказывают существенное влияние на секрецию кортизола, устойчивость к стрессу и формирование его отсроченных последствий. Индивидуальная реакция на стресс может быть связана с различным состоянием систем крови, депонирующих и транспортирующих кортизол [5]. Исследования Booij и Stroud и соавторов показывают, что реакции кортизола на однократное воздействие психосоциального стресса, а также циркадные паттерны свободного кортизола в слюне не отличаются у испытуемых с высокими или низкими баллами по экстраверсии, нейротизму или психотизму [4]. По мнению ряда авторов, использование АКТГ в качестве показателя не выявило различий между испытуемыми с разной выраженностью психологических черт. Вероятно, это связано с тем, что АКТГ отражает ежедневную активность оси НРА и применим для выявления эндокринной патологии [6].

Примечательно, что маркером многих проблем подросткового возраста является дисбаланс кортизола и стероидных гормонов. Согласно Oskis A и соавторам, анорексия

коррелирует с повышенной секрецией кортизола и дегидроэпиандростерона [7]. Экспериментальные данные указывают на нарушение регуляции функции оси Гипоталамус-Гипофиз-Надпочечники при анорексии у подростков, о чем свидетельствует гиперсекреция как кортизола, так и дегидроэпиандростерона. Дегидроэпиандростерон является предшественником андрогенов и эстрогенов, синтез которых завершается в периферических тканях. Увеличение концентрации половых стероидов нарушает регуляцию оси HPG и может быть причиной нарушения регуляции [8]. Этот вывод подтверждается данными Luz Neto и соавторов, из которых следует, что у подростков с расстройствами пищевого поведения, особенно нервной анорексией, повышен уровень кортизола [9]. Dockray и соавторы [10] исследовали депрессию, реактивность кортизола и ожирение в детском и подростковом возрасте. Результаты показали, что депрессия связана с более высоким индексом массы тела и повышенной секрецией кортизола в ответ на стресс. Обобщенные, эти данные подчеркивают, что кортизол может оказывать влияние в подростковом возрасте на развитие личностных черт и поведенческих синдромов. Наиболее значимым является значение концентрации кортизола, определяемое вскоре после пробуждения. Повышенная интроверсия была связана с более низкими реакциями на пробуждение кортизола как у мужчин, так и у женщин-участников [11]. Экстраверсия в значительной степени предсказывала общую концентрацию кортизола в момент пробуждения. Женщины демонстрировали большую общую реакцию на пробуждение кортизола, чем мужчины [11]. Динамика концентрации кортизола в слюне или в крови в течение дня с момента пробуждения до засыпания также имеет диагностическое значение. Было показано, что более ровные ритмы кортизола в течение дня бодрствования коррелируют с более высоким нейротизмом у обследуемых мужского пола [10].

Литература

1. Booij SH, Bouma EM, de Jonge P, Ormel J, Oldehinkel AJ.: Chronicity of depressive problems and the cortisol response to psychosocial stress in adolescents: the TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology* 2013, 38(5):659666. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.08.004.
2. Samantha Dockray, Elizabeth J. Susman, Lorah D. Dorn: Depression, Cortisol Reactivity, and Obesity in Childhood and Adolescence. *Journal of Adolescent Health* 2009, 45: 344-350. doi.org/10.1016/j.jadohealth.2009.06.014
3. Sundin, Zachary & Chopik, William & Welker, Keith & Ascigil, Esra & Brandes, Cassandra & Chin, Kristi & Ketay, Sarah & Knight, Erik & Kordsmeyer, Tobias & McLarney-Vesotski, Amber & Prasad, Smrithi & Reese, Zachary & Roy, Ashlin & Sim, Lester & Stern, Julia & Carré, Justin & Edelstein, Robin & Mehta, Pranjali & Penke, Lars & Tackett, Jennifer: (2021). Estimating the Associations between Big Five Personality Traits, Testosterone, and Cortisol. *Adaptive Human Behavior and Physiology* 2021. doi./10.1007/s40750-020-00159-9.
4. Booij SH, Bouma EM, de Jonge P, Ormel J, Oldehinkel AJ.: Chronicity of depressive problems and the cortisol response to psychosocial stress in adolescents: the TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology* 2013, 38(5):659666. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.08.004.
5. Garipova M.I., Shigapova A.I., R.G.Farkhutdinov, V.V. Fedyaev, J. M. Sotnikova, A.B. Yakupova.: The distribution of 3,5,30-triiodothyronine between the transport systems of blood and nuclei of the tissues. *Journal of biomolecular structure and dynamics* 2019, 37(s1): 44-45 doi 10.1080/07391102.2019.1604468

6. Samantha Dockray, Elizabeth J. Susman, Lorah D. Dorn: Depression, Cortisol Reactivity, and Obesity in Childhood and Adolescence. *Journal of Adolescent Health* 2009, 45: 344-350. doi.org/10.1016/j.jadohealth.2009.06.014
7. Oskis A, Clow A, Thorn L, Loveday C, Hucklebridge F.: Differences between diurnal patterns of salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in healthy female adolescents. *Stress* 2012, 15(1):110-114. doi: 10.3109/10253890.2011.582529.
8. Catherine B. Stroud, Frances R. Chen, Leah D. Doane, Douglas A. Granger: Individual differences in early adolescents' latent trait cortisol (LTC): Relation to early adversity. *Developmental Psychology* 2016, 52(6): 700-713.
9. Luz Neto LMD, Vasconcelos FMN, Silva JED, Pinto TCC, Sougey ÉB, Ximenes RCC.: Differences in cortisol concentrations in adolescents with eating disorders: a systematic review. *J Pediatr (Rio J)*. 2019, 95(1):18-26. doi: 10.1016/j.jped.2018.02.007.
10. Dockray S., Elizabeth J. Susman, Lorah D. Dorn: Depression, Cortisol Reactivity, and Obesity in Childhood and Adolescence. 2009, 344-350. doi.org/10.1016/j.jadohealth.2009.06.014
11. Condon E: Psychosocial Influences on Acceptability and Feasibility of Salivary Cortisol Collection From Community Samples of Children. *Res Nurs Health* 2016, 39(6):449-462. doi: 10.1002/nur.21744. Epub 2016 Sep 30.

Cortisol as a biomarker of adolescent temperament traits

M.I.Garipova , S.A. Bashkatov , L.M. Habibullina

*Bashkir State University
32 ZakiValidi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia*

**Email: margaritag@list.ru*

Neurochemical biomarkers of temperament traits differ in their nature and influence on behavior in different age groups. The article considers the role of cortisol in the formation of the adolescent's temperament traits.

Keywords: biomarkers of temperament traits, cortisol, eating disorders, neuroticism.

Мелатонин снижает токсичность меди для растений огурца

© И.Ф. Головацкая*, Р.А. Городова, Е.В. Бойко, И.Н. Плюснин, М.К. Кадырбаев

Национальный исследовательский Томский государственный университет
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

*Email: golovatskaya.irina@mail.ru

Для повышения устойчивости растений огурца к действию высокой концентрации меди предложена методика обработки их семян или корней раствором мелатонина низкой концентрации.

Ключевые слова: *Cucumis sativus*, мелатонин, медь, прорастание семян, рост и развитие растений, фотосинтетические пигменты, перекисное окисление липидов, устойчивость к тяжёлым металлам

В настоящее время одной из причин ухудшения качественного состава почв и воды является загрязнение их тяжёлыми металлами (ТМ). Активное поглощение ТМ растениями и последующее накопление их вдоль пищевой цепи создаёт потенциальную угрозу для здоровья человека. Представителем ТМ является медь, которая служит важным микроэлементом для растений, регулируя окислительно-восстановительные процессы [1-3]. Она играет существенную роль в процессах дыхания, поскольку входит в состав цитохромоксидазы, аскорбиноксидазы и полифенолоксидазы. Медь также участвует в синтезе хлорофилла, в световой стадии фотосинтеза на уровне ЭТЦ в составе медьсодержащего белка – пластоцианина. Она регулирует сигналинг гормонов, входя в состав рецептора этилена. Однако при высоких концентрациях медь является опасным фитотоксикантом, снижающим активность и биосинтез ряда ферментов. Переизбыток этого элемента может провоцировать дефицит железа в растениях.

Среди факторов эндогенной регуляции и управления в растительном организме выделяют фитогормоны. Изначально обнаруженный у животных и человека мелатонин относят к гормонам, регулирующим циркадные ритмы, сезонную репродуктивную физиологию организмов, иммунитет и др. [2, 4, 5]. У растений показано присутствие мелатонина и зависимость его уровня от абиотических и биотических негативных факторов среды. На сегодняшний день окончательно не установлена гормональная функция для фитомелатонина, поскольку последняя требует наличия сигналинга, в том числе его рецепции в клетках. Несмотря на это, показано участие мелатонина в таких процессах, как рост, ризогенез и фотосинтез [2, 4, 5]. Он снижает токсическое воздействие различных тяжёлых металлов [2].

В настоящее время востребовано изучение физиолого-генетических аспектов устойчивости растений к действию ТМ, поскольку это способствует созданию генетического банка устойчивости культурных растений к ТМ и разработке способов повышения их продуктивности и получения экологически чистой растительной продукции.

Целью данного исследования стало изучение протекторного действия мелатонина на морфофизиологические процессы растений огурца в условиях повышенной концентрации ионов меди.

Объектом исследования служили проростки огурца *Cucumis sativus* L. сорта Изящный, выведенного во ВНИИССОК селекционером О.В. Юриной и в 1971 году включенного в Госреестр России.

В ходе исследования изучали влияние разных концентраций ионов меди и мелатонина в среде на энергию прорастания и всхожесть семян, размеры и строение структурных элементов проростков огурца, содержание фотосинтетических пигментов, окислительный статус.

Эксперимент проводили в асептических условиях, начиная от стерилизации семян огурца до автоклавирования среды культивирования. Семена проращивали в водных растворах смеси меди и мелатонина разных концентраций. В качестве контрольной среды служил водный раствор, содержащий 12,5 мкг/л 5-водного медного купороса или 3,2 мкг/л ионов меди, что было аналогично его количеству в 50% среде Мурасиге-Скуга (МС). В качестве опыта брали широкий диапазон концентраций ионов меди (от 6,4 до 80,0 мкг/л), что позволило определить степень устойчивости данного сорта огурца к микроэлементу. Для оценки протекторного действия мелатонина на растения были выбраны 100-кратно различающиеся его концентрации (10 пМ и 1 нМ). Для анализа морфологических и биохимических параметров проводили эксперимент с сокращённым диапазоном концентраций ионов меди (от 3,2 до 16,0 мкг/л). Для этого 5-дневные проростки огурца, перешедшие на фототрофный тип питания, переносили из водных растворов на 50 %-ную питательную среду МС, содержащую 3,2 мкг/л ионов меди (контроль) и МС с добавлением разных концентраций ионов меди и мелатонина (опыт) и культивировали в течение 4 суток в условиях осветительной установки при 16 ч фотопериоде на свету с интенсивностью 150 мкмоль фотонов/м²с при температуре 22,0±2,0° С.

В результате исследования установлено, что действие меди на процессы в зародышах семян и проростках огурца зависело от её концентрации в питательной среде. Увеличение концентрации ионов меди в растворе в 2-5 раз снижало энергию прорастания (3 сутки) и всхожесть семян (5 сутки) (рис. 1), тогда как в 10-25 раз – полностью тормозило (последние данные не приведены).

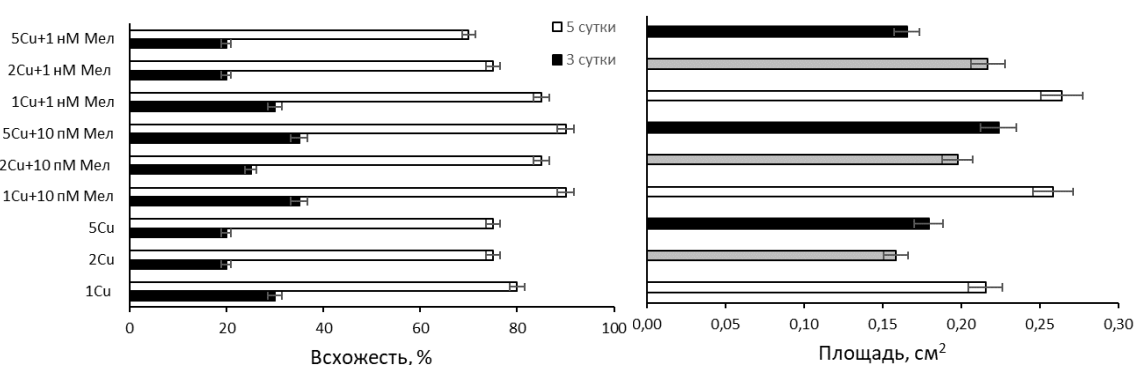


Рис. 1. Зависимость энергии прорастания семян (3 сутки), их всхожести (5 сутки) и площади семядолей проростков (9 сутки) от концентрации меди (Cu) и мелатонина (Мел) в среде: индекс при Cu показывает кратность увеличения концентрации относительно контроля.

Добавление мелатонина в медь-содержащую 50% питательную среду МС повышало как энергию прорастания, так и всхожесть семян огурца. Наиболее высокая всхожесть семян наблюдалась при действии мелатонина низкой концентрации 10 пМ. Возможно, это связано с воздействием мелатонина на растяжение клеток зародыша, т.е. осуществлением им гормональной функции при минимальных концентрациях. Результаты согласуются с нашими данными по взаимодействию индоламина с ИУК при растяжении клеток колеоптиля. Именно низкие концентрации мелатонина с ИУК обеспечивают наибольший ростовой эффект [4]. В нашем исследовании добавление экзогенного мелатонина привело к повышению выживаемости проростков, что вероятно было обусловлено его протекторным действием. Негативное действие высоких концентраций 32 - 80 мкг/л ионов меди 1,0 нМ мелатонин не смог снять (данные не приведены).

Изучение медь-зависимой регуляции морфогенеза проростков показало, что повышение уровня меди в среде приводило к уменьшению ветвления корней и их размеров, укорочению стебля и площади семядолей и в результате к уменьшению биомассы проростков (рис. 1, рис. 2 а-в). В противоположность действию меди, мелатонин увеличивал длину и ветвление корней, а также площадь поверхности семядолей и соответственно биомассу проростков (рис. 1, рис. 2 г).

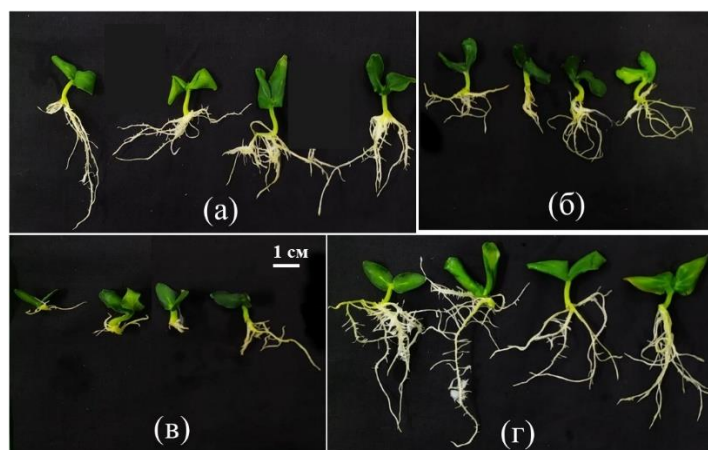


Рис. 2. Внешний вид 9-дневных проростков огурца, культивированных на среде МС+3,2 мкг/л Cu (а, контроль), МС+6,4 мкг/л Cu (б), МС+16,0 мкг/л Cu (в) и МС+3,2 мкг/л Cu+10 пМ мелатонин (г).

Наибольшее содержание сухого вещества и наименьшее содержание воды было обнаружено у проростков огурца контрольного варианта и составило 14,5 и 85,5% соответственно. 2-кратное увеличение концентрации меди в среде приводило к повышению воды в проростках. Это могло быть связано с повышением осмотического давления в клетке за счёт ионов меди и сульфата и активного притока воды. В тоже время 5-кратное увеличение концентрации меди снижало и биомассу и содержание воды, что могло быть обусловлено негативным действием меди на функциональную активность клеток. Добавление экзогенного 10 пМ мелатонина в среду повышало содержание воды в растениях всех вариантов, тогда как 1 нМ мелатонина - уровень воды повышался только при норме меди. Эффективность мелатонина снижалась при действии больших концентраций экзогенной меди.

Анализ сформированности фотосинтетического аппарата проводили по уровню фотосинтетических пигментов и площади семядолей (см рис. 1) растений огурца. Установ-

лено, что при 2-кратном увеличении концентрации экзогенной меди происходило снижение содержания Хл *a* и каротиноидов по сравнению с контролем. Добавление мелатонина в контрольную среду повышало содержание зелёных пигментов в семядолях, при низкой концентрации мелатонина – Хл *b*, а при высокой – Хл *a*. Протекторное действие мелатонина с повышением уровня меди (6,4 и 16,0 мкг/л) проявилась только при увеличении его концентрации до 1 нМ. При этом восстанавливался уровень Хл *b* (6,4 мкг/л), Хл *a* и каротиноидов (16,0 мкг/л) (данные не приведены).

Окислительный статус структурных элементов проростков огурца зависел от их функциональной активности (рис. 3). Независимо от варианта опытных растений в корне и семядолях перекисное окисление липидов (ПОЛ) было выше, чем в стебле. Увеличение уровня ионов меди до 16,0 мкг/л в среде снизило интенсивность ПОЛ в корне (белые столбцы). Добавление мелатонина низкой концентрации во всех 3-х вариантах меди увеличивало интенсивность ПОЛ. Основным источником АФК в корне служит дыхание, поэтому с увеличением его интенсивности могли быть связаны эффекты мелатонина. Повышение концентрации мелатонина до 1 нМ снизило интенсивность ПОЛ, что согласуется с его антиоксидантными свойствами.

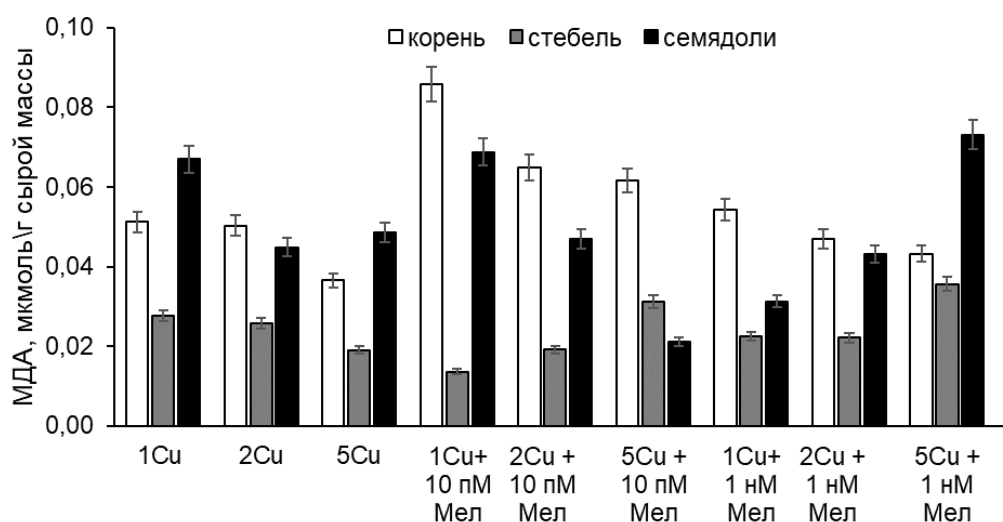


Рис. 3. Зависимость интенсивности перекисного окисления структурных элементов проростка огурца от концентрации меди (Cu) и мелатонина (Мел) в среде.

В отличие от корня в семядолях (черные столбцы) интенсивность ПОЛ начинала снижаться при действии более низких концентраций ионов меди (6,4 мкг/л). Основываясь на известных фактах об источниках АФК в семядолях – дыхания и фотосинтеза, можно предположить снижение интенсивности этих процессов под действием меди. 1 нМ мелатонин снижал негативный эффект 5-кратного уровня меди в семядолях, что сопровождалось повышением интенсивности ПОЛ, вероятно вызванной интенсификацией процессов фотосинтеза [5]. В варианте с контрольным уровнем меди эта концентрация мелатонина проявляла антиоксидантные свойства. Разные ответные реакции корня и семядолей на одни и те же концентрации меди и мелатонина вероятно связаны с их доступностью и органоспецифичными функциями.

Совокупность представленных данных позволяет сделать вывод о том, что уже 2-кратное увеличение концентрации ионов меди относительно уровня в среде МС в присутствии сульфат-ионов оказывала негативное действие на ростовые и физиологиче-

ские характеристики растений огурца, и свидетельствовало о высокой чувствительности к меди растений огурца на начальных этапах онтогенеза. Экзогенный мелатонин снижал повреждающее действие меди. Степень протекторного действия мелатонина зависела от его концентрации и интенсивности стресс-фактора. Для повышения устойчивости растений огурца к действию повышенной концентрации меди в почве или воде может быть предложена обработка их семян или корней раствором мелатонина низкой концентрации.

Литература

1. Кушнарева О.П., Перекрестова Е.Н. Влияние различных концентраций солей меди и свинца на содержание хлорофилла и содержание углерода в листьях растений // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 10 (185). С. 294-297.
2. Холодова В.П., Васильев С.В., Ефимова М.В., Воронин П.Ю. Рахманкулова З.Ф., Данилова Е.Ю., Кузнецов Вл.В. Экзогенный мелатонин защищает растения рапса от токсического действия избытка меди // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 6. С. 463–471. DOI: 10.1134/S0015330318060088
3. Головацкая И.Ф., Кабил Ф., Когай В., Кайлер О.А., Нечаева М.В., Гавенко А.А., Гурина Е.В. Устойчивость растений-регенерантов *Solanum tuberosum* к ионам меди *in vitro* // Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 10-13 апр. 2018 г. Томск: Издательский Дом ТГУ, 2018. С. 40-45.
4. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Карначук Р.А. Роль мелатонина в регуляции ИУК-зависимых реакций растений в разных условиях освещения // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2017. №37. С. 144–160. DOI: 10.17223/19988591/37/8
5. Бойко Е.В., Головацкая И.Ф., Бендер О.Г., Плюснин И.Н. Влияние кратковременной корневой обработки мелатонином на фотосинтез листьев огурца // Физиология растений. 2020. Т. 67, № 2. С. 196-205. DOI: 10.31857/S0015330320020037

Melatonin reduces copper toxicity to cucumber plants

I.F. Golovatskaya*, R.A. Gorodova, E.V. Boyko, I.N. Plyusnin, M.K. Kadyrbaev

National Research Tomsk State University, 3640 Lenin Ave., Tomsk, 634050 Russia

*Email: golovatskaya.irina@mail.ru

We increased the resistance of cucumber plants to a high concentration of copper by treating seeds or roots with a low concentration of melatonin.

Keywords: *Cucumis sativus*, melatonin, copper, seed germination, plant growth and development, photosynthetic pigments, lipid peroxidation, resistance to heavy metals.

Вовлечённость генов медиаторов воспаления в формирование индивидуальных различий в уровне депрессивности

© Ю. Д. Давыдова¹, А. В. Казанцева¹, Р. Ф. Еникеева¹, Р. Н. Мустафин²,
М. М. Лобаскова³, С. Б. Малых³, Э. К. Хуснутдинова¹

¹*Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71, лит. 1Е.*

²*Башкирский государственный медицинский университет
Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, ул. Ленина, 3.*

³*Психологический институт Российской академии образования
Россия, 125009 г. Москва, ул. Моховая, 9к4.*

*Email: julia.dmitrievna@list.ru

Целью настоящего исследования являлась оценка основных эффектов полиморфных локусов генов *TNF* (*rs1041981*, *rs1800629*), *IL6* (*rs1800795*) и *IL6R* (*rs2228145*), а также ген-средовых взаимодействий в фенотипических вариациях уровня депрессивности у 1035 психически здоровых индивидов с учётом половой и этнической принадлежности. В результате статистического анализа был выявлен значимый модулирующий эффект таких средовых факторов, как сезон рождения и порядок рождения, в случае ассоциации полиморфных локусов *rs1041981* и *rs1800629* с уровнем депрессивности.

Ключевые слова: депрессия, депрессивность, воспаление, ген-средовые взаимодействия.

Депрессия (депрессивное расстройство, ДР) – это психическое расстройство, характеризующееся патологически сниженным настроением, торможением интеллектуальной и моторной деятельности, снижением витальных побуждений с пессимистической оценкой себя и своего положения в окружающей действительности. Как известно, ДР является многофакторной психопатологией, предрасположенность к которой определяется действием широкого спектра психологических, социальных, нейрохимических и наследственных факторов, а также их взаимодействием между собой [1]. Согласно результатам близнецовых исследований, коэффициент наследуемости депрессии составляет 29–46% для различных фенотипов ДР [2], причём значительный вклад в формирование признака, наряду с моноаминергическими системами, вносит явление воспалительного процесса в организме. Об этом свидетельствуют данные о повышенной экспрессии воспалительных медиаторов, в частности С-реактивного белка острой фазы воспаления CRP (ген *CRP*), фактора некроза опухоли альфа (*TNF*) и интерлейкинов (*IL1B*, *IL6*) у пациентов с депрессивным эпизодом. Это объясняется тем, что стресс любого происхождения, которому подвергаются индивиды, сопровождается ростом концентрации цитокинов в крови и повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Подобные изменения приводят к способности циркулирующих в крови цитокинов проникать в мозг, запускать нейровоспалительные реакции, что может способствовать развитию ДР и других психопатологий. Вместе с тем, существуют убедительные доказательства того, что под воздействием воспалительных медиаторов зна-

чительно снижается синаптическая доступность моноаминов, что, как известно, является одним из основных механизмов в патогенезе ДР [3].

Известно, что ряд средовых факторов может выступать в качестве триггера для развития повышенной депрессивности посредством механизмов эпигенетической регуляции. Результаты близнецовых исследований свидетельствуют о том, что проявление фенотипа, связанного с расстройством поведения, варьируется в зависимости от места проживания (в городской или сельской местности), от характера детско-родительских взаимоотношений, этнической и половой принадлежности индивида (что может быть обусловлено различиями в деятельности нервной и эндокринной систем, в транскрипционных профилях генов мужчин и женщин), а также от других факторов [4]. Исходя из этого, в рамках психогенетических исследований особо актуальным представляется учёт модулирующего эффекта средового компонента в анализе ассоциаций полиморфных локусов генов с исследуемым признаком.

Целью данного исследования является оценка основного эффекта полиморфных локусов генов *TNF* (*rs1041981*, *rs1800629*), *IL6* (*rs1800795*) и *IL6R* (*rs2228145*), а также ген-средовых взаимодействий (gene×environment interaction, G×E) в формировании индивидуальных различий в уровне депрессивности у психически здоровых индивидов.

Материалы и методы исследования. В качестве материала в настоящем исследовании использовалась ДНК 1035 индивидов без наследственной отягощенности психическими заболеваниями (79.13% женщин) в возрасте 18-25 лет (средний возраст: 21.85±1.71 лет) – студентов ВУЗов РФ разной этнической принадлежности (русских – 344, татар – 262, удмуртов – 224, башкир – 106, индивидов смешанной этнической принадлежности – 99). У всех индивидов была собрана информация социального характера, включающая этническую принадлежность до трёх поколений, особенности детско-родительских отношений, уровень доходов семьи, место воспитания, число детей в семье и порядок рождения, наличие хронических заболеваний, табакокурения и др. Все участники заполнили добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

Для определения уровня депрессивности была использована шкала депрессии Бека (Beck Depression Inventory). Для молекулярно-генетического анализа полиморфных локусов была использована ДНК, выделенная методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование 4 полиморфных локусов генов *TNF* (*rs1041981*, *rs1800629*), *IL6* (*rs1800795*) и *IL6R* (*rs2228145*) проводилось методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов (LGC Genomics, UK) на амплификаторе «CFX96» (BioRad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке.

Статистическая обработка результатов включала линейный регрессионный анализ с включением половой и этнической принадлежности в качестве ковариат (PLINK v.1.9). Оценка эффекта ген-средовых взаимодействий была осуществлена с помощью множественного линейного регрессионного анализа, в котором в качестве независимых переменных выступали полиморфные локусы, социальные факторы, половая и этническая принадлежность, в то время как уровень депрессивности – в качестве зависимой переменной. Стратификационный анализ был проведен с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (SPSS 21). Процедура FDR (False Discovery Rate) была использована для коррекции на множественность сравнений (PLINK v.1.9).

Результаты и обсуждение. Результаты оценки распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *TNF* (*rs1041981*, *rs1800629*), *IL6* (*rs1800795*) и *IL6R* (*rs2228145*) соответствовали распределению Харди-Вайнберга ($P = 0.11$ для *rs1041981*, $P = 0.51$ для *rs1800629*, $P = 0.51$ для *rs1800795*, $P = 0.44$ для *rs2228145*).

В результате линейного регрессионного анализа не было выявлено ассоциации полиморфных локусов генов *TNF* (*rs1041981*, *rs1800629*), *IL6* (*rs1800795*) и *IL6R* (*rs2228145*) с вариациями уровня депрессивности ($P > 0.05$). Последующий стратификационный анализ, проведенный среди мужчин, женщин, индивидов русской, татарской, удмуртской и башкирской этнической принадлежности, также не продемонстрировал ассоциаций с уровнем депрессивности.

Вторым этапом обработки результатов являлась оценка эффекта ген-средовых взаимодействий, учитывающего, наряду с генетическими вариантами, вовлеченность различных социальных параметров. Таким образом, было показано, что такие факторы, как «сезон рождения» и «порядок рождения» модулируют ассоциацию полиморфных локусов в гене *TNF* с индивидуальным уровнем депрессивности. В частности, более низкий уровень депрессивности был более характерен для носителей минорного аллеля *rs1041981**A, родившихся осенью, по сравнению с индивидами, рожденными в другое время года ($\beta = -2.002$; $r^2 = 0.025$; $P = 0.011$; $P_{FDR} = 0.045$). Предполагается, что вовлеченность «сезона рождения» в вариации депрессивности и других свойств личности может быть опосредована сезонными изменениями в частоте некоторых инфекционных заболеваний, различиями в рационе питания в период пренатального развития и другими особенностями. Данные факторы могут оказывать влияние на возникновение врожденных структурных и функциональных изменений мозга, а также на уровень активности нейромедиаторных систем. Кроме того, было обнаружено, что носители аллеля *rs1800629**A, являющиеся младшими из трёх или большего числа детей в семье, имели более высокие средние показатели депрессивности ($\beta = 3.667$; $r^2 = 0.057$; $P = 0.028$). Обнаруженный эффект может быть объяснен исходя из «теории истощения ресурсов», согласно которой каждый последующий ребенок требует от родителей больше ресурсов, а в условиях их дефицита (если индивид является младшим ребенком в семье) могут формироваться различия в уровне депрессивности, связанные со стрессовой чувствительностью, в зависимости от наличия определенного варианта *rs1800629* в гене *TNF* [5].

Вывод. Таким образом, выявленные нами ассоциации уровня депрессивности с такими средовыми факторами, как «сезон рождения» и «порядок рождения», могут указывать на возможные эпигенетические изменения, затрагивающие тонкую регуляцию генной экспрессии в онтогенезе, что требует проведения дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№ АААА-А21-121011990119-1). Образцы ДНК взяты из ЦКП «Коллекция биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Литература

1. Смулевич А. Б. Депрессии при психических и соматических заболеваниях // М.: Медицинское информационное агентство, 2015. 640 с.
2. Kendler K. S., Gatz M., Gardner C. O., Pedersen N. L. A Swedish national twin study of lifetime major depression // *Am. J. Psychiatry*. 2006. V. 163(1). P. 109–114. DOI 10.1176/appi.ajp.163.1.109.
3. Давыдова Ю. Д., Еникеева Р. Ф., Казанцева А. В. и др. Генетические основы предрасположенности к депрессивным расстройствам // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 23. № 4. С. 465–472. DOI 10.18699/VJ19.515.

4. Мустафин Р. Н., Еникеева Р. Ф., Давыдова Ю. Д., Хуснутдинова Э. К. Роль эпигенетических факторов в развитии депрессивных расстройств // Генетика. 2018. Т. 54. № 12. С. 1376–1389. DOI 10.1134/S001667581812010X.
5. Härkönen J. Birth Order effects on educational attainment and educational transitions in West Germany // Eur. Sociol. Rev. 2014. V. 30(2). P. 166–179. DOI 10.1093/esr/jct027.

The role of inflammatory cytokine genes in individual differences in depression level

Yu. D. Davydova^{1*}, A. V. Kazantseva¹, R. F. Enikeeva¹, R. N. Mustafin², M. M. Lobaskova³, S.B. Malykh³, E.K. Khusnutdinova¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Bashkir State Medical University
3 Lenin Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

³*Psychological Institute of Russian Academy of Education
9/4 Mokhovaya Street, 125009 Moscow, Russia.*

*Email: julia.dmitrievna@list.ru

The present study aimed to assess the main effects of *TNF* (*rs1041981*, *rs1800629*), *IL6* (*rs1800795*) and *IL6R* (*rs2228145*) gene polymorphisms together with G×E effects on individual differences in depression level in 1035 mentally healthy individuals with sex and ethnicity as covariates. As a result of statistical analysis we observed that birth season and order of birth significantly affected association of *rs1041981* and *rs1800629* and depression level.

Keywords: depression, depressiveness, inflammation, gene-environment interactions.

Анализ распространения полиморфного варианта *rs5219* гена *KCNJ11* в популяции ингушей

© М.А. Джаубермезов^{1,2*}, Э.Т. Мингажева^{1,2}, А.Б. Якупова¹, Н.В. Екомасова^{1,2},
Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹*Башкирский государственный университет*

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²*Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение*

ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН

Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, проспект Октября, 71.

*e-mail: murat-kbr@mail.ru

Сахарный диабет 2 типа является многофакторным заболеванием. Развитие данного заболевания связано со сложным взаимодействием различных генов и факторов окружающей среды. Полиморфизм *rs5219* гена *KCNJ11* является фактором риска развития сахарного диабета 2 типа. Ген *KCNJ11* кодирует белок Kir6.2, который формирует внутреннюю часть калиевых каналов в бета-клетках поджелудочной железы. Данное исследование направлено на изучение полиморфизма *rs5219* гена *KCNJ11* в популяции ингушей, чей язык относится к вайнахской группе северокавказской языковой семьи. Генотипирование проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Частота варианта 23Lys в выборке ингушей составила 37,79% (95% CI: 30,5-45,5).

Ключевые слова: ингуши, *KCNJ11*, калиевый канал, генотипирование

В последние годы частота диагностирования сахарного диабета в мире неуклонно растёт, этому способствует рост урбанизации, ведение малоподвижного образа жизни и пр. [1,2]. По оценочным данным количество людей, страдающих данным заболеванием во всем мире к 2040 году может составить более 640 млн. [3,4]. Ген *KCNJ11* (11p15.1) содержит один экзон и кодирует белок Kir6.2, который образует внутреннюю часть аденозинтрифосфат-чувствительного ионного калиевого канала в бета-клетках поджелудочной железы и играет решающую роль в секреции инсулина [5]. Полиморфизм *rs5219* гена *KCNJ11* характеризуется заменой гуанина (G) на аденин (A) в кодоне 23, что приводит к замене глутаминовой (Gln) кислоты на лизин (Lys), что приводит к увеличению секреции инсулина [6-8].

Ранее уже было описано распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs5219* в различных популяциях мира. Так, максимальные значения рискового аллеля были выявлены в популяциях Южной Азии (40%), а также в популяциях Европы (35%) [9]. Популяции Африки характеризуются минимальными значениями (2%) [9].

Актуальность данного исследования высока в связи с отсутствием данных о распределении частот аллелей *rs5219* в популяциях Северного Кавказа и, в частности, ингушей.

Целью настоящей работы является изучение частот аллелей *rs5219* гена *KCNJ11* в популяции ингушей.

Нами была проанализирована ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови в общей сложности 86 неродственных ингушей с территории Республики Ингушетия (Российская Федерация). В результате анкетирования была установлена этническая принадлежность исследуемых индивидов с указанием предков до третьего поколения. От всех участников было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение ДНК из периферической крови осуществляли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [10]. Забор крови осуществлялся в фирменные пробирки Vacutainer®, с использованием 0,5 М раствора ЭДТА в качестве консерванта, после чего пробирки встряхивали и хранили при температуре 4°C.

Генотипирование полиморфного локуса *rs5219* гена *KCNJ11* осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan. Популяционные частоты аллельных вариантов вычисляли на основе наблюдаемых частот генотипов. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона (при $p > 0,05$). Достоверность различий в частотах аллелей между исследованными выборками вычисляли по критерию χ^2 с применением поправки Йейтса на непрерывность.

Нами было изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs5219* гена *KCNJ11* в популяции Восточного Кавказа. В исследованной выборке ингушей распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди–Вайнберга (табл. 1). В популяции ингушей частота минорного аллеля составила 37,79% (30,5-45,5) что соответствует диапазону частот, встречающихся в европейских и азиатских популяциях.

Таблица 1. Распределение генотипов *rs5219* гена *KCNJ11* в популяции ингушей

Популяция	N	Генотипы			Частота минорного аллеля (95% ДИ)	χ^2
		GG	GA	AA		
Ингуши	86	33 (38,37%)	41 (47,67%)	12 (13,95%)	37,79% (30,5-45,5)	0,8970

Частоты аллелей в изученной популяции ингушей, а также достоверность различий приведена в сравнении с популяциями, данные по которым получены из литературных источников (табл. 2). В связи с тем, что частота минорного аллеля в популяции ингушей сопоставима с таковыми в европейских и азиатских популяциях и существенно отличается от африканских, для сравнения были использованы данные по распределению частот в популяциях европейского и азиатского континентов, а также коренного населения Америки. Статистические различия обнаружены между популяцией ингушей и популяцией англичан, а также коренными народами Америки (табл. 2).

Таблица 2. Частота минорного аллеля в выборке ингушей и в некоторых мировых популяциях, а также сравнение популяций (p-value)

Популяция	N	Частота минорного аллеля	Ингуши
Ингуши*	86	37,79%	
Финляндия [9]	99	44%	0,233
Англия и Шотландия [9]	91	26%	0,028
Испания [9]	107	38%	0,999
Тоскана, Италия [9]	107	29%	0,068
Европа в общем [9]	503	35%	0,584
Бангладеш [9]	86	41%	0,581
Пакистан [9]	96	44%	0,251
Южная Азия в целом [9]	489	40%	0,721
Коренное население Америки [9]	347	29%	0,037

Таким образом, в данном исследовании впервые изучен полиморфизм *rs5219* гена *KCNJ11* в популяции ингушей, населяющих горные и предгорные области восточной части Северного Кавказа. В изученной популяции вариант 23Lys встречается с частотой, характерной для европейских и азиатских популяций. Эти особенности следует учитывать при ассоциативных и фармакогенетических исследованиях.

Работа поддержана программой поддержки биоресурсных коллекций (Коллекция биологических материалов человека ИБГ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН).

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FZWU-2020-0027).

Литература

1. Gupta, M. K., & Vadde, R. In silico identification of natural product inhibitors for γ -secretase activating protein, a therapeutic target for Alzheimer's disease // Journal of Cellular Biochemistry. 2018. V. 120(6). P. 10323–10336.
2. Huang, Z., Liao, Y., Huang, R., Chen, J., & Sun, H. Possible role of TCF7L2 in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // Biotechnology & Biotechnological Equipment 2018. V. 32(4). P. 830–834.
3. Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Makaroff, L. E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 // Diabetes Research and Clinical Practice. 2017. V. 128, 40–50.

4. Sun, P., Liu, L., Chen, J., Chen, Y., Shi, L., Imam, M. U., Fu, X. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis // *Medicine*. 2017. V. 96(47), e8745.
5. Osama Makhzoom, Younes Kabalan, Faizeh AL-Quobaili Association of KCNJ11 rs5219 gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus in a population of Syria: a case-control study // *BMC Med Genet*. 2019. V. 20: 107.
6. Haghvirdizadeh P, Mohamed Z, Abdullah NA, Haghvirdizadeh P, Haerian MS, Haerian BS. KCNJ11: genetic polymorphisms and risk of diabetes mellitus // *J Diabetes Res*. 2015. P. 908152.
7. Wang DD, Chen X, Yang Y, Liu CX. Association of Kir6.2 gene rs5219 variation with type 2 diabetes: a meta-analysis of 21,464 individuals // *Prim Care Diabetes*. 2018. V. 12(4) P. 345–353.
8. Schwanstecher C, Meyer U, Schwanstecher M. KIR6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing over-activity of pancreatic b-cell ATP-sensitive K channels // *Diabetes*. 2002. V. 51. P. 875–879.
9. The 1000 Genomes Project Consortium.
10. Mathew, C. G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Methods Mol. Biol*. 1984. V. 2. P. 31-34.

Analysis of the distribution of the rs5219 polymorphic variant of the KCNJ11 gene in the Ingush population

M.A. Dzhaubermezov^{1,2*}, E.T. Mingazheva^{1,2}, A.B. Yakupova¹, N.V. Ekomasova^{1,2}, E.K. Khusnutdinova^{1,2}

¹*Bashkir State University*

Russia, Republic of Bashkortostan, 450076 Ufa, street Zaki Validi, 32.

²*Institute of Biochemistry and Genetics is a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences*

Russia, 450054, Republic of Bashkortostan, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71.

* e-mail: murat-kbr@mail.ru

Type 2 diabetes mellitus is a multifactorial disease. The development of this disease is associated with a complex interaction of various genes and environmental factors. The rs5219 polymorphism of the KCNJ11 gene is a risk factor for the development of type 2 diabetes. The KCNJ11 gene encodes the Kir6.2 protein, which forms the interior of the potassium channels in the beta cells of the pancreas. This study is aimed at studying the rs5219 polymorphism of the KCNJ11 gene in the Ingush population, whose language belongs to the Vainakh group of the North Caucasian language family. Genotyping was performed by real-time PCR using competing TaqMan probes. The frequency of the 23Lys variant in the sample of Ingush was 37,79% (95% CI: 30,5-45,5).

Key words: Ingush, KCNJ11, potassium channel, genotyping

Процесс биокоррозии стали и влияние на него электромагнитного поля

© Дубовик И.Е.¹, Шарипова М.Ю.^{1*}, Гафарова В.А.², Наумкин Е.А.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет»
Россия, Уфа, 450076, ул. Заки Валиди, 32.

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет»
Россия, Уфа, 450064, ул. Космонавтов, 1.

Email: dubovikie@mail.ru

Исследовано влияние электромагнитного поля на биокоррозию стали марки 09Г2С. Проведен лабораторный эксперимент с использованием нитчатых цианобактерий (*Nostoc linckia*, *Oscillatoria brevis*) и одноклеточных зеленых водорослей (*Mychonastes homosphaera*, *Chlorella vulgaris*, *Myrmecia incisa*), которые вносились в чашки Петри с почвой и компактными образцами стали. Чашки Петри подвергались действию магнитного поля в течение 504, 1008, 1512 часов. Влияние электромагнитного поля оценивали по скорости коррозии, по изменению напряжения магнитного поля и испытанию снижения прочности металла методом малого удара. Показано, что цианобактерии и зеленые водоросли не оказывали отрицательного воздействия на скорость коррозии, снижение прочности металла, при этом наблюдалось увеличение напряжения магнитного поля.

Ключевые слова: цианобактерии, зеленые водоросли, коррозия металла, электромагнитное поле

Актуальная проблема в нефтяной и газовой промышленности - продление ресурса работы технологического оборудования с сохранением его безопасной эксплуатации. Одной из наиболее распространенных причин отказов промысловых трубопроводов была и остается коррозия трубопровода. При проведении мониторинга коррозии часто используется метод внутритрубной магнитной диагностики, что приводит к намагничиванию стенки трубопровода снарядами-дефектоскопами и созданию электромагнитного поля. При этом практически отсутствуют исследования, касающиеся влияния электромагнитного поля на биокоррозию трубопровода [1].

Биокоррозия вызывается и стимулируется жизненным процессом различных микроорганизмов (водорослей, бактерий, дрожжей, грибов) [4]. Их жизнедеятельность напрямую зависит от использования металла как питательной среды, также выделяемые продукты жизнедеятельности, оказывают разрушающее влияние на металл. Микроорганизмы, находящиеся непосредственно в воде и почве могут спровоцировать серьезные коррозионные повреждения металла. Почвогрунты определенных составов, некоторые органические продукты и застойные воды оказывают благоприятное действие для формирования и развития биологической коррозии. В основном биокоррозия наслаивается на другие типы коррозии [2].

Цель работы – изучение влияния электромагнитного поля на биокоррозию стали марки 09Г2С. Практическая значимость работы заключается в исследовании влияния электромагнитного поля на процесс биокоррозии металла, что позволяет установить величину влияния биоорганизмов под воздействием остаточной намагниченности после внутритрубной магнитной диагностики на функциональное состояние объекта контроля и определение способов антикоррозионной защиты, что приведет к снижению аварийности по причине биокоррозии трубопроводов.

Материалы и методы. Проводили исследования по влиянию электромагнитного поля на коррозию компактных образцов из стали марки 09Г2С при различной временной экспозиции с использованием микроорганизмов различных таксономических групп, которые являются постоянными обитателями почвы [3]. Это нитчатые цианобактерии *Nostoc linckia*, *Oscillatoria brevis* (отдел Цианопросаргота) и одноклеточные зеленые водоросли *Mychonastes homosphaera*, *Chlorella vulgaris*, *Myrmecia incisa* (отдел Chlorophyta). В опытах использовали чистые культуры последних, выращенные в колбах Эрленмейера с использованием жидкой среды Громова № 6 [5].

Для проведения исследования из стержня данной марки стали были изготовлены компактные образцы токарно-фрезерным путем, конфигурация образцов имеет цилиндрическую форму диаметром 8 мм, толщиной 0,6 – 1,2 мм. Затем образцы обрабатывали на шлифовальном станке Metkon Grinder-Polisher 2V с использованием специально изготовленной оснастки для компактных образцов до образования толщины 0,7 мм.

Компактные образцы из стали марки 09Г2С помещали в почву с цианобактериями и зелеными водорослями в чашки Петри, и затем выдерживали их под влиянием или без магнитных полей в течение различных промежутков времени (21, 42 и 63 дня). Для создания магнитных полей устанавливали кольцевидные магниты под чашками Петри. Использовали неодимовые магниты N38 имеющие форму кольца (диаметр 50 мм, толщина 5 мм, вес 46 г, сила сцепления 13,59 кг).

Оценка коррозионной агрессивности среды. Проводили оценку коррозионной агрессивности среды по отношению к металлу образцов с использованием следующих показателей:

– среднюю скорость проникновения коррозии (Π , мм/год);

– максимальную скорость проникновения местной коррозии.

Показатели коррозии (в единицах измерения – миллиметров в год) определяются по формулам ниже :

$$\Pi = 8760 \cdot \frac{(m_0 - m_1)}{s \cdot t \cdot d}$$

$$\Pi = 8760 \cdot \frac{h}{t}$$

где m_0, m_1 – массы образца до и после испытания, г;

8760 – количество часов в году;

s – площадь поверхности образца, м²;

t – время экспозиции, ч;

d – плотность металла, кг/м³;

h – максимальная глубина коррозионных повреждений, мм.

Коррозионную агрессивность среды оценивают по максимальному значению показателей коррозии.

Рекомендуемая продолжительность экспозиции образцов – 1 месяц.

Определение изменения напряжения постоянного магнитного поля. Постоянное магнитное поле компактных образцов измеряли, используя измеритель концентрации напряжений ИКН-9М-12.

Метод испытания снижения предела прочности металла с малым ударом. Метод испытания снижения предела прочности при сжатии образцов проводили по показани-ям Small Punch test, проведенного на сервогидравлической испытательной машине «Сервогидравлическая испытательная машина Instron 8801» со специально изготов-ленной оснасткой-пунсоном из стали марки У7 для компактных образцов и дальней-шей его закалкой в муфельной электропечи

Результаты и их обсуждение. Анализ данных скорости биокоррозии показал, что при длительной выдержке образцов при участии цианобактерий и зеленых водорослей не зафиксировано отрицательного воздействия их на данный параметр (табл.1). Наобо-рот, наблюдается некоторое снижение скорости коррозии, особенно при внесении в почву цианобактерий. Также не наблюдалось снижения прочности металла (рис.1).

Таблица1. Результаты расчета скорости коррозии ($\times 10^{-7}$ мм/год) компактных образцов из стали марки 09Г2С после испытания в потенциально агрессивных средах

Вариант опыта	Длительность, час		
	501	1008	1512
Почва	1,8	2,1	1,9
Почва+магнитное поле	1,8	1,6	1,4
Цианобактерии+магнитное поле	2,3	1,8	1,6
Зеленые водоросли +магнитное поле	1,7	1,6	1,5

Сравнение характеристики напряженности магнитного поля компактных образцов из стали марки 09Г2С, выдержанных в почве вместе с цианобактериями и водорослями, показало, что напряженность при этом повышалась. Полученные показатели зависи-мости напряжений магнитного поля от времени выдержки приведены в табл.2.

Таблица 2. Зависимость напряженности магнитного поля (А/см) от времени выдержки компактных образцов из стали марки 09Г2С в потенциально агрессивных средах

Вариант опыта	Длительность, час		
	501	1008	1512
Почва	0,9	1,0	1,1
Почва+магнитное поле	1,5	2,4	3,4
Цианобактерии+магнитное поле	1,7	2,7	4,3
Зеленые водоросли +магнитное поле	1,9	3,5	5,0

Проведенные нами эксперименты не позволили сделать однозначного вывода о влия-нии магнитного поля на биокоррозию при внесении культур цианобактерий и водорос-лей, что подтверждает необходимость проведения дальнейших исследований в дан-ной области.

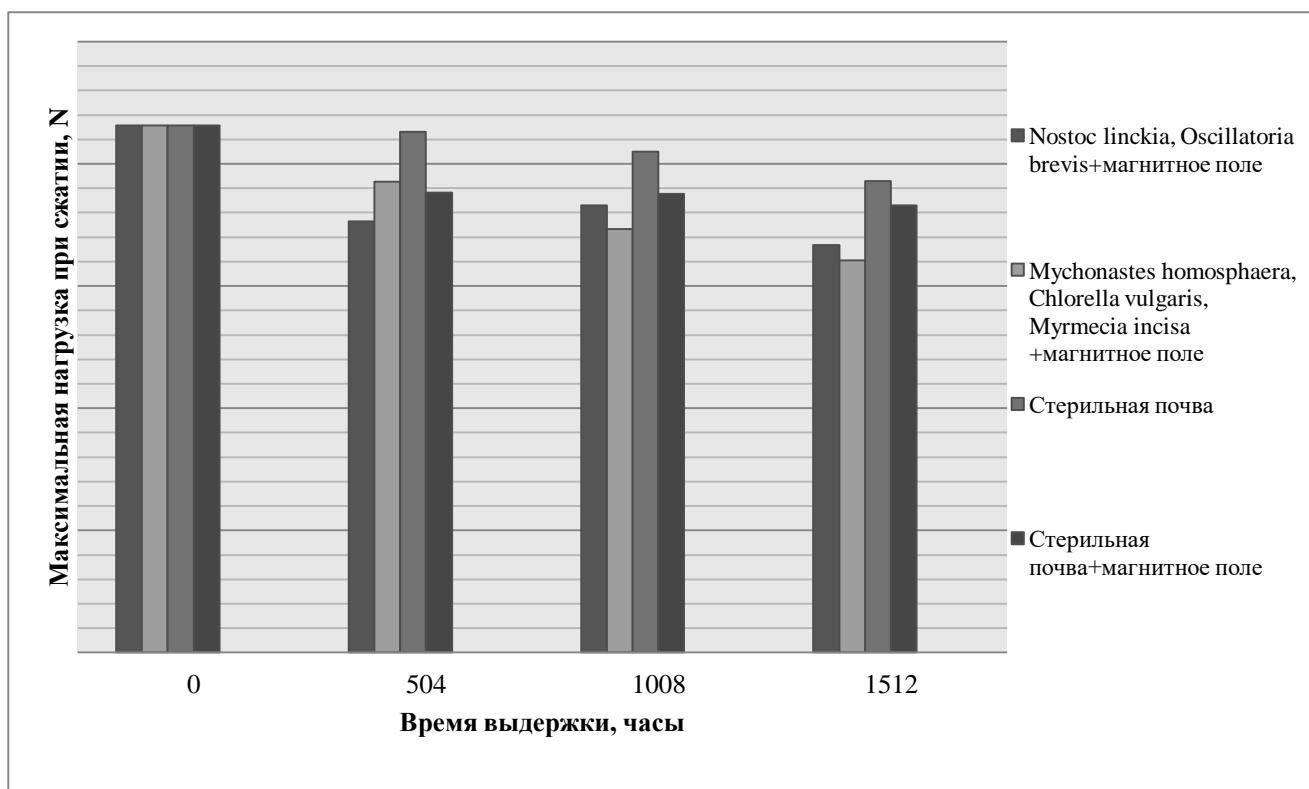


Рисунок 1. Влияние электромагнитного поля на предельную нагрузку (N) разрушения образцов.

Литература.

1. Андреева Д.Д., Фахрутдинов Р.З. Коррозионно–опасная микрофлора нефтяных месторождений // Вестник Казанского технологического университета. 2013. №10. С. 237-242.
2. Бажанова М.Е., Ерофеев В.Т. Стойкость трубопроводных материалов в условиях воздействия почвенных микроорганизмов // Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В.Г. Шухова. 2012. № 1. С.31-33.
3. Дубовик И.Е., Наумкин Е.А., Шарипова М.Ю., Тельцова Л.З. Влияние биокоррозии на механические свойства материалов трубопроводов // Безопасность жизнедеятельности. 2019. №11 (227). С. 32-38.
4. Рязанов А.В., Вигдорович В.И., Завершинский А.Н. Биокоррозия металлов. Теоретические представления, методы подавления // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2003. №5. С.821-837.
5. Шарипова М. Ю., Дубовик И.Е. Современные методы альгологии. Уфа: РИЦ БашГУ, 2012. 116 с.

The process of biocorrosion of steel and the influence of the electromagnetic field on it

Dubovik I.E.^{1}, Sharipova M.Yu.¹, Gafarova V.A..², Naumkin E.A.²*

¹FSBEI HE Bashkir State University, 32, Zaki Validi str., Ufa, 450076, Russia

²FSBEI HE Bashkir State Petroleum Technological University, 1 Kosmonaftov str., Ufa, , 450064, Russia

**Email: dubovikie@mail.ru*

The influence of the electromagnetic field on the biocorrosion of steel grade 09G2S is investigated. A laboratory experiment was conducted using filamentous cyanobacteria (*Nostoc linckia*, *Oscillatoria brevis*) and single-celled green algae (*Mychonastes homosphaera*, *Chlorella vulgaris*, *Myrmecia incisa*), which were introduced into Petri dishes with soil and compact steel samples. Petri dishes were exposed to a magnetic field for 504, 1008, 1512 hours. The influence of the electromagnetic field was evaluated by the corrosion rate, by the change in the magnetic field voltage and by testing the reduction in the strength of the metal by the small impact method. It was shown that cyanobacteria and green algae did not have a negative effect on the corrosion rate, a decrease in the strength of the metal, while an increase in the magnetic field voltage was observed.

Key words: *cyanobacteria, green algae, metal corrosion, electromagnetic field*

Вовлеченность генов медиаторов воспаления в формирование невербального интеллекта: эффект аполипопротеина E

© Еникеева Р.Ф.^{1,2*}, Казанцева А. В.^{1,2}, Давыдова Ю. Д.¹, Мустафин Р. Н.³, Тахирова З.Р.², Лобаскова М.М.⁴, Михайлова А. В.⁵, Федореева К.С.⁵, Малых С.Б.⁴, Хуснутдинова Э.К.^{1,3}

¹*Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
450054 г. Уфа, проспект Октября, 71 лит. Е.*

²*Российская академия образования, Центр междисциплинарных исследований в сфере наук об образовании
119121 г. Москва, ул. Погодинская, 8.*

³*Башкирский государственный медицинский университет
450008 г. Уфа, ул. Ленина, 3.*

⁴*Психологический институт Российской академии образования
125009 г. Москва, ул. Моховая, 9/4.*

⁵*Башкирский государственный университет
450076 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.*

*Email: Enikeevarf@gmail.com

В результате оценки основного эффекта полиморфных вариантов генов воспалительного ответа организма и эффекта ген-средовых взаимодействий в формирование когнитивных характеристик у индивидов без когнитивных нарушений была показана ассоциация гаплотипа *TNF*AA* (rs1041981, rs1800629) ($\beta=1.53$; $P=0.033$; $P_{perm}=0.047$) с повышенными показателями невербального интеллекта у индивидов без когнитивных нарушений - носителей варианта $\epsilon 4$ гена *APOE*.

Ключевые слова: медиаторы воспаления, фактор некроза опухолей альфа; аполипопротеин E; когнитивные способности; линейная регрессия; ген-средовые взаимодействия.

В течение последнего десятилетия особый интерес в области когнитивных наук и генетики комплексных признаков направлен на выявление молекулярно-генетических предикторов, связанных с развитием особенностей когнитивного функционирования. Изучение последнего приобретает особую актуальность, поскольку уровень когнитивного функционирования лежит в основе жизненного успеха, трудоспособности и самореализации каждого человека. Одним из показателей когнитивного функционирования является невербальный интеллект, который связывают с успехами в использовании математических навыков и в STEM-дисциплинах (от англ. Science, Technology, Engineering, Mathematics).

Известно, что механизмы, лежащие в основе формирования индивидуального уровня когнитивных способностей, являются комплексными, причем генетические и эпигенетические факторы при этом играют существенную роль (Mustafin et al., 2020). В течение

последнего десятилетия особое распространение получила гипотеза о вовлеченности нейронального воспаления в развитие когнитивных нарушений, включая болезнь Альцгеймера и другие деменции (Flex et al., 2014). К системе провоспалительного ответа организма относят белки, кодируемые генами С-реактивного белка (*CRP*), интерлейкина 1 α (*IL1a*), интерлейкина 1 β (*IL1B*), фактора некроза опухолей альфа (*TNF*), пуринергического рецептора P2X7 (*P2X7R*) и ряда других. Кроме того, группы исследователей продемонстрировали необходимость введения индивидуального варианта в гене аполипопротеина E (*APOE*) (в частности, ϵ 4-аллеля) в качестве ковариаты при оценке генетического эффекта системы медиаторов воспаления на снижение когнитивного функционирования (Licastro et al., 2007; Sasayama et al., 2020). Таким образом, учитывая гипотезу непрерывного континуума развития когнитивных нарушений, можно предположить, что определенные варианты генов провоспалительного ответа организма совместно с геном *APOE* могут быть также связаны со снижением когнитивных функций (невербального интеллекта, в частности) в популяции в более раннем возрасте. Кроме того, к настоящему времени число исследований, включающих анализ вышеуказанных генов в развитие особенностей когнитивного функционирования у здоровых людей без когнитивного дефицита, немногочисленно.

Таким образом, целью настоящего исследования являлась оценка основного эффекта полиморфных вариантов генов воспалительного ответа организма и эффекта ген-средовых взаимодействий в формировании невербального интеллекта у индивидов без когнитивных нарушений.

Материалом для исследования послужила ДНК 1011 индивидов без когнитивных нарушений (80% женщин) в возрасте 18-25 лет (средний возраст: 19.79 \pm 1.69 лет) – студентов ВУЗов РФ разной этнической принадлежности (535 русских, 231 татар, 160 удмуртов, 85 индивидов смешанной этнической принадлежности). Включенные в исследование индивиды отрицали у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям и не состояли на учёте у психиатра и нарколога. Оценка невербального интеллекта производилась с использованием прогрессивных матриц Равена на основе цифровой платформы, разработанной сотрудниками Российской академии образования. У всех индивидов была собрана информация социального характера, включающая этническую принадлежность до трёх поколений, особенности детско-родительских отношений (стиль родительского воспитания, эпизоды плохого обращения в детстве, воспитание в полной/неполной семье), уровень доходов семьи, возраст матери и отца при рождении ребёнка, вес ребёнка при рождении, место воспитания, число детей в семье и порядок рождения, знание своего родного языка (билингвизм), наличие хронических заболеваний и табакокурения. Все участники заполнили добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

Для молекулярно-генетического анализа полиморфных локусов была использована ДНК, выделенная методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование восьми полиморфных локусов генов *CRP* (rs3093077), *IL1a* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *TNF* (rs1041981, rs1800629), *P2X7R* (rs2230912), *APOE* (rs7412, rs429358) проводилось методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов (LGC Genomics, UK) на амплификаторе «CFX96» (BioRad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке. Генотипы в гене *APOE* были сгруппированы на основании наличия аллелей ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4.

Статистическая обработка результатов включала проверку на нормальность распределения количественных данных, соответствие распределения частот аллелей и генотипов тесту Харди-Вайнберга. Линейный регрессионный анализ с включением половой, этнической принадлежности и наличия «рискового» аллеля *APOE* ϵ 4 в качестве ковариат был использован для оценки основного эффекта полиморфного локуса

(PLINK v.1.09). Анализ проводился с использованием аддитивной, доминантной и рецессивной статистических моделей. Чтобы оценить эффект ген-средовых взаимодействий была проведена серия множественных линейных регрессионных анализов, в которых полиморфные локусы, социальные характеристики, половая и этническая принадлежность выступала в качестве независимых переменных, а уровень невербального интеллекта – в качестве зависимой. Последующий стратификационный анализ был проведен с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (SPSS 23). Для коррекции на множественность сравнений была осуществлена процедура FDR (False Discovery Rate) или способ перестановок (permutation test) (PLINK v.1.09).

В результате регрессионного анализа, оценивавшего эффект восьми изученных полиморфных локусов генов системы воспалительного ответа организма, был выявлен основной эффект минорных аллелей А полиморфных локусов rs1800629 ($\beta=1.79$; $P=0.019$) и rs1041981 ($\beta=1.49$; $P=0.019$) в гене фактора некроза опухоли альфа (*TNF*) на проявление более высокого уровня невербального интеллекта в доминантной модели. Однако после коррекции на множественность сравнений данный эффект оказался статистически незначимым. Тем не менее, после обнаружения неравновесия по сцеплению между двумя локусами rs1800629 и rs1041981, находящимися в промоторном регионе гена *TNF*, был проведен гаплотипический анализ. Последний продемонстрировал ассоциацию гаплотипа *TNF**AA (rs1041981, rs1800629) ($\beta=1.53$; $P=0.033$; $P_{perm}=0.047$) с повышенными показателями невербального интеллекта у индивидов без когнитивных нарушений, которая осталась значимой после коррекции на множественность.

В результате анализа ген-средовых взаимодействий, учитывающего, наряду с генетическими вариантами, эффект различных социальных параметров, было показано, что табакокурение модулирует ассоциацию локуса rs2230912 в гене *P2X7R* ($\beta = -1.70$; $P = 0.022$) с индивидуальными вариациями показателя невербального интеллекта. В частности, среди курящих индивидов носители минорного аллеля G в гене *P2X7R* демонстрировали снижение уровня невербального интеллекта ($\beta=-1.64$; $P=0.025$) по сравнению с носителями мажорного генотипа A/A. Кроме того, модель ген-средовых взаимодействий, включающая полиморфный локус rs1041981 в гене *TNF* и число детей в семье ($\beta = -1.39$; $P = 0.025$), позволила выявить ассоциацию с уровнем невербального интеллекта. Стратификационный анализ показал, что при воспитании в многодетной семье индивиды с минорным аллелем А локуса rs1041981 характеризовались в среднем более высоким уровнем невербального интеллекта по сравнению с носителями генотипа C/C ($\beta=0.248$, $P=0.002$).

Согласно литературным данным, аллель А полиморфного локуса rs1800629 в гене *TNF* ассоциирован с улучшением процессов внимания, способности к пространственному вращению 3D-предметов, скоростью обработки информации (Beste et al., 2010). В то же время, мажорный аллель G в этом локусе был связан с увеличением риска развития когнитивных нарушений, в частности, за счет увеличения уровня белка p-TAU в спинномозговой жидкости (который является биомаркером такого нейродегенеративного заболевания как болезнь Альцгеймера) (Babic Leko et al., 2020; Culjak et al., 2020). Полученные нами данные об ассоциации гаплотипа AA в гене *TNF* с улучшением невербального интеллекта согласуются с вышеотмеченными. С другой стороны, модель ген-средовых взаимодействий указывает на важный вклад количества детей в семье на вовлеченность другого локуса в гене *TNF* (rs1041981) в формирование особенностей когнитивного развития. На основании опубликованных данных, можно предположить, что воспитание в семье с большим количеством сиблингов оказывает определенный эффект, связанный с активацией системы воспалительного ответа, при котором носительство аллеля С в локусе rs1041981 гена *TNF* будет приводить к усилению воспалительного ответа организма, приводя к снижению уровня интеллекта.

Известно, что пуриnergический рецептор P2X7 (P2X7R) участвует в регуляции высвобождения интерлейкина 1 β и других цитокинов, что позволило выявить его участие в развитии некоторых психических нарушений на уровне полиморфного локуса rs2230912 (миссенс мутация Gln460Arg) (Deussing and Arzt, 2018). В частности, был продемонстрирован негативный эффект наличия минорного аллеля G на увеличение тяжести депрессивной симптоматики (Vereczkei et al., 2019). В нашей работе данный аллель G локуса rs2230912 был связан со снижением уровня интеллекта, но только среди индивидов, отмечавших наличие табакокурения в настоящий период жизни. Известно, что аддиктивное поведение (включая табакокурение) может использоваться для нивелирования тревожного состояния, которое, в свою очередь, коррелирует с депрессивностью. Кроме того, литературные данные также указывают на вовлеченность гена P2X7R в манифестацию когнитивного дефицита вследствие увеличения его экспрессии как у людей, так и у модельных животных (Francistiova et al., 2020).

Полученные нами данные свидетельствуют об эпистатическом эффекте генов медиаторов воспаления, на уровне генов TNF и P2X7R) и апополипротеина E в развитие не только когнитивных нарушений, но и индивидуальных вариаций в уровне невербального интеллекта.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№АААА-А21-121011990119-1). Образцы ДНК взяты из ЦКП "Коллекция биологических материалов человека" ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Литература

1. Mustafin R.N., Kazantseva A.V., Malykh S.B. Khusnutdinova E.K. Genetic mechanisms of cognitive development // Russian Journal of Genetics. 2020. V. 56(8). P. 891-902.
2. Flex A., Giovannini S., Biscetti F. et al. Effect of proinflammatory gene polymorphisms on the risk of Alzheimer's disease // Neurodegener. Dis. 2014. V. 13(4). P. 230-236.
3. Licastro F., Porcellini E., Caruso C. et al. Genetic risk profiles for Alzheimer's disease: integration of APOE genotype and variants that up-regulate inflammation // Neurobiol. Aging. 2007. V. 28(11). P. 1637-1643.
4. Sasayama D., Hattori K., Yokota Y. et al. Increased apolipoprotein E and decreased TNF- α in the cerebrospinal fluid of nondemented APOE- ϵ 4 carriers // Neuropsychopharmacol. Rep. 2020. V. 40(2). P. 201-205.
5. Beste C., Heil M., Domschke K. et al. Associations between the tumor necrosis factor alpha gene (-308G \rightarrow A) and event-related potential indices of attention and mental rotation // Neuroscience. 2010. V. 170(3). P. 742-748.
6. Babić Leko M., Nikolac Perković M., Klepac N. et al. IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF α Single Nucleotide Polymorphisms in Human Influence the Susceptibility to Alzheimer's Disease Pathology // J. Alzheimers Dis. 2020. V. 75(3). P. 1029-1047.
7. Culjak M., Perkovic M.N., Uzun S. et al. The Association between TNF-alpha, IL-1 alpha and IL-10 with Alzheimer's Disease // Curr. Alzheimer. Res. 2020. V. 17(11). P. 972-984.

8. Deussing J.M., Arzt E. P2X7 Receptor: A Potential Therapeutic Target for Depression? // Trends Mol. Med. 2018. V. 24(9). P. 736-747.
9. Vereczkei A., Abdul-Rahman O., Halmai Z. et al. Association of purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms with depression symptoms // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2019. V. 92. P. 207-216.
10. Francistiová L., Bianchi C., Di Lauro C. et al. The Role of P2X7 Receptor in Alzheimer's Disease // Front. Mol. Neurosci. 2020. V. 13. P. 94.

The involvement of inflammatory system genes in individual variance in non-verbal intelligence: the effect of apolipoprotein E

R.F. Enikeeva^{1,2*}, A.V. Kazantseva^{1,2}, Yu. D. Davydova¹, R.N. Mustafin³, Z.R. Takhirova², M.M. Lobaskova⁴, A.V. Mikhailova⁵, K.S. Fedoreeva⁵, S.B. Malykh⁴, E.K. Khusnutdinova^{1,3}

¹*Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Russian Academy of Education, Centre of interdisciplinary research in education
8 Pogodinskaya Street, 119121 Moscow, Russia.*

³*Bashkir State Medical University
3 Lenin Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

⁴*Psychological Institute of Russian Academy of Education
9/4 Mokhovaya Street, 125009 Moscow, Russia.*

⁵*Bashkir State University
32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Russia.*

**Email: Enikeevarf@gmail.com*

The assessment of the main effect of inflammatory system gene polymorphisms and the effect of gene-by-environment interactions in individual differences in cognitive abilities conducted in mentally healthy individuals without cognitive decline revealed the association of the TNF AA-haplotype (rs1041981, rs1800629) ($\beta=1.53$; $P=0.033$; $P_{perm}=0.047$) with higher non-verbal intelligence score in individuals carrying the APOE $\epsilon 4$ variant.

Keywords: inflammation, tumor necrosis factor alpha, apolipoprotein E, cognitive abilities, linear regression, gene-environment interactions.

Идентификация мутаций у больных незавершенным остеогенезом из Республики Башкортостан

© Зарипова А.Р.^{1*}, Хусаинова Р.И.^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, 450054, Уфа

²ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, 450076, Уфа

*E-mail: a.ramilna@bk.ru

Проведено молекулярно-генетическое исследование незавершенного остеогенеза в 103 отягощенных семьях. Идентифицированы 9 типов патогенных мутаций у 12 пациентов в генах *COL1A1*, *COL1A2* и *IFITM5*: 2 дупликации, 1 делеция, 2 нонсенс, 3 миссенс, 1 – сдвига рамки считывания.

Ключевые слова: генетика; наследственные заболевания; незавершенный (несовершенный) остеогенез; гены коллагена; множественные переломы; синдром голубых склер; секвенирование; мутации; полиморфные варианты; NGS-секвенирование.

Незавершенный остеогенез (НО) (МКБ-10: Q78.0, несовершенный остеогенез) – это клинически и генетически гетерогенное наследственное заболевание, характеризующееся многочисленными переломами [1].

Более 80% случаев НО связаны с доминантно-наследуемыми мутациями в генах *COL1A1* или *COL1A2* [3]. В остальных случаях, в патогенез заболевания вовлечены 19 «неколлагеновых» генов, многие из которых отвечают за аутосомно-рецессивный тип наследования, за исключением генов *IFITM5* и *WNT1*, которые обуславливают аутосомно-доминантные формы.

В Республике Башкортостан зарегистрирован 151 пациент с НО в 145 семьях, частота заболевания составила 1:27937 населения, что сопоставимо с частотой заболевания в некоторых странах мира.

Учитывая клиническую и генетическую гетерогенность заболевания, а также тяжелое и инвалидизирующее течение, выявление молекулярно-генетической причины каждого конкретного случая НО является актуальной задачей для определения прогноза течения и проведения медико-генетического консультирования отягощенных семей.

Цели и задачи. Целью данного исследования является поиск структурных изменений в генах, участвующих в патогенезе НО, с последующей идентификацией выявленных изменений, определением патогенетической значимости и клинико-генетических корреляций, типа наследования и формы заболевания.

Материалы и методы. В нашей работе были использованы образцы ДНК 116 больных незавершенным остеогенезом из 103 семей и 148 родственников. Основными методами являлись выделение ДНК методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови, полимеразная цепная реакция, секвенирование по Сэнгеру и NGS-технология.

Результаты и обсуждение. В проведенном нами исследовании были идентифицированы 9 типов изменений с патогенной значимостью у 12 пациентов в генах *COL1A1*, *COL1A2* и *IFITM5*. В гене ***COL1A1*** были идентифицированы следующие патогенные мутации:

- ранее неопиcанная в литературе мутация с.375dupC, p.Ala126fs, приводящая к сдвигу рамки считывания. У пробанда (пол женский, 1966 г.р.) данная мутация возникла de novo. У пациента обнаружены: тугоухость, голубые склеры, контрактура левого локтевого сустава, тазобедренных и коленных суставов, множественные переломы. У родителей пробанда данная мутация не была найдена. Родители фенотипически здоровы.

- у двух пробандов идентифицирована мутация с.579delT (p.Gly194ValfsX71), в первом случае мутация возникла de novo, во втором – днк отца недоступно для анализа. В литературе мутация описана, как вовлеченная в патогенез НО 1 типа. Это изменение последовательности создает сигнал преждевременной остановки трансляции (p.Gly194Valfs * 71) в гене *COL1A1*. Варианты с потерей функции в *COL1A1*, как известно, являются патогенными. У первого пробанда (пол мужской, 2002 г.р.), обнаружены следующие клинические проявления: множественные переломы, брахицефалия, синие склеры, гипермобильность суставов, мышечная гипотония, деформация верхних и нижних конечностей, зубы неровные, янтарного цвета, речь с дефектами. У второго (пол мужской, 1995 г.р.), - склеры голубые, рахитические браслетки, гиперподвижность суставов, плоскостопие, сколиоз, деформация грудной клетки, множественные переломы [4].

- нонсенс мутация с.967G>T(p.Gly323X) патогенетическая мутация у пробанда (пол женский, 1991 г.р.) и его матери, 1969 г.р.. Данное изменение приводит к НО 1 типа. Клинические проявления заболевания у пациента: у пробанда – 4 перелома, голубые склеры, уши без мочек, зубы светло-коричневые, мышечная гипотония, гиперэкстензия суставов, выраженный остеопороз, у матери – около 20 переломов. У отца пробанда данная мутация отсутствует [1].

- нонсенс мутация с.658C>T, p.Arg220* найдена у пробанда (пол мужской, 2012 г.р). Данное изменение приводит к НО 1 типа. Множество переломы, вальгусная деформация конечностей, Голубые склеры, зубы янтарного цвета, крошатся, грудная клетка конической формы. Мать и отец фенотипически здоровы, их ДНК для генетического анализа недоступны [5].

- миссенс мутация с.2461G>A, p.Gly821Ser найдена у пробанда (пол женский, 1992 г.р). Об этом варианте сообщалось у многих людей с несовершенным остеогенезом (НО) типов I-IV, причем НО типа IV является наиболее распространенным (PMID: 26177859, 26627451, 27519266, 21667357, 21884818, 17078022). Также было показано, что этот вариант возникает de novo у человека, пораженного НО типа III (PMID: 9101304). В анамнезе множественные переломы. Фенотип: сколиоз, деформация нижних конечностей, голубые склеры. Тип наследования на данный момент невозможно выяснить, так как ДНК членов семьи недоступно для анализа [6,7,8].

В гене ***COL1A2*** были идентифицированы следующие патогенетические мутации, являющиеся причиной возникновения НО у пациентов:

- миссенс мутация с.874G>A;p.Gly292Ser у пробанда (пол мужской, 2001 г.р). Согласно базе данных университета Лейдена, мутация описана у пациентов с НО I и III типов. Обнаружено: множественные переломы, плоско-вальгусные стопы, позвоночник искривлен, склеры голубые, зубы желто-янтарного оттенка, выраженная мышечная гипотония, гипермобильность суставов. Тип наследования на данный момент невозможно выяснить, так как ДНК членов семьи недоступно для анализа [9,10].

- дупликация с.1897_1902dupGCTGGT, p.Ala633_Gly634dup у пробанда (пол женский, 2001 г.р.). Данная мутация не была описана в литературе и по предсказательным программам (*in silico*) оценена, как вероятно патогенная. Обнаружено: 4 перелома, голова акроцефальной формы, выраженные лобные бугры, голубые склеры, самостоятельно не ходит, множественные деформации верхних и нижних конечностей, килевидная деформация грудной клетки, грудной кифоз, низкий рост, саблевидная деформация правого плеча, частичный птоз, гипотиреоз. У матери пробанда данная мутация не найдена, ДНК отца недоступна для генетического анализа.

- миссенс мутация с.G2341C:p.G781R у пробанда (пол мужской, 2016 г.р.), возникшая *de novo*. В базе данных ClinVar и HGMD описана, как патогенная (SM194715). Данная мутация приводит к НО 1 типа. У пробанда обнаружено: множественные переломы с рождения, крупная голова, склеры голубые.

Также найдена мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* у трех неродственных пациентов. У двух пациентов наблюдается клиническая картина V типа НО, у третьего пациента также выявлена ранее неописанная мутация с.1903C>T: p.Arg635* в гене *LAMB3*, что привело к стертой клинической манифестации V типа НО. Нами впервые было обнаружено сочетание двух молекулярных дефектов у пациентки с основным диагнозом НО V типа [2].

Заключение. Таким образом, нами были идентифицировано: 1 дупликация, 1 делеция, 2 нонсенс и 1 миссенс мутации в гене *COL1A1*, в гене *COL1A2* - 2 миссенс и 1 дупликация. Также найдена мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* у трех неродственных пациентов. У одного пациента дополнительно выявлена ранее неописанная мутация с.1903C>T: p.Arg635* в гене *LAMB3*, что привело к стертой клинической манифестации.

Литература

1. Надыршина Д.Д., Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К.. Исследование α 1 цепи коллагена 1 типа (*COL1A1*) у больных несовершенным остеогенезом // Генетика. 2012. Т 48. № 3. С. 372–380.
2. Зарипова А.Р., Нурғалиева Л.Р., Тюрин А.В., Миннихметов И.Р., Хусаинова Р.И. Поиск мутаций в гене интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*) у больных несовершенным остеогенезом. Медицинская генетика 2019; 18(10): 21-29.
3. Joan C. Marini, An D., Dang Do, Kenneth R Feingold, Bradley Anawalt. Osteogenesis Imperfecta. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTtext.com, Inc.; 2000–2020 Jul 26.
4. Zhytnik L., Maasalu K., Pashenko A., etc. *COL1A1/2* Pathogenic Variants and Phenotype Characteristics in Ukrainian Osteogenesis Imperfecta Patients. Front Genet. 2019 Aug 9;10:722. doi:10.3389/fgene.2019.00722.
5. Zhang H., Yang R, Wang Y., etc. A pilot study of gene testing of genetic bone dysplasia using targeted next-generation sequencing. J Hum Genet. 2015 Dec;60(12):769-76. doi: 10.1038/jhg.2015.112.
6. Kloen P, Donders JCE, Eekhoff EMW, Hamdy RC. Pauwels Osteotomy for Femoral Neck Nonunion in Two Adult Siblings with Osteogenesis Imperfecta. Hip Pelvis. 2018;30(1):53-59. doi:10.5371/hp.2018.30.1.53

7. Mohd Nawawi N, Selveindran NM, Rasat R, et al. Genotype-phenotype correlation among Malaysian patients with osteogenesis imperfecta. *Clin Chim Acta*. 2018;484:141-147. doi:10.1016/j.cca.2018.05.048
8. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat*. 2007;28(3):209-221. doi:10.1002/humu.20429
9. Ho Duy B, Zhytnik L, Maasalu K, et al. Mutation analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes in Vietnamese patients with osteogenesis imperfecta. *Hum Genomics*. 2016;10(1):27. Published 2016 Aug 12. doi:10.1186/s40246-016-0083-1
10. Rolvien T, Stürznickel J, Schmidt FN, et al. Comparison of Bone Microarchitecture Between Adult Osteogenesis Imperfecta and Early-Onset Osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2018;103(5):512-521. doi:10.1007/s00223-018-0447-8

The identification of mutations in patients with osteogenesis imperfecta from the Republic of Bashkortostan

Zaripova A.R.^{1*}, Khusainova R.I.^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Branch of the Russian Academy of Sciences;

² Republican Medical Genetics Center, Ufa; ³ Bashkir State Medical University, Ufa

*e-mail: a.ramilna@bk.ru

A molecular genetic study of osteogenesis imperfecta in 103 burdened families was carried out. 9 types of pathogenic mutations were identified in 12 patients in the COL1A1, COL1A2 and IFITM5 genes: 2 duplications, 1 deletion, 2 nonsense, 3 missense, 1 frame shift.

Key words: *genetics; hereditary diseases; incomplete (imperfect) osteogenesis; collagen genes; multiple fractures; blue sclera syndrome; sequencing; mutations; polymorphic variants; NGS sequencing.*

Особенности клеточной гибели моноцитов больных атопической бронхиальной астмой

© Б.Р. Ибрагимов, Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова

*Казанский (Приволжский) федеральный университет
Россия, Республика Татарстан, 420008 г. Казань, улица Кремлевская, 18*

Email: ibragimov94@inbox.ru

Для оценки характера программируемой клеточной гибели использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии и установили существенные морфологические отличия - у больных тяжелой формой атопической бронхиальной астмой в основном встречаются макрофаги с признаками развития аутофагии.

Ключевые слова: апоптоз, каноническая аутофагия, Лар-ассоциированный фагоцитоз, макрофаги, атопическая бронхиальная астма.

Многолетние исследования специалистов показали, что, в иммунопатогенезе атопической бронхиальной астмы ведущую роль играют нарушения регуляции как гуморальных, так и клеточных реакций иммунной системы на специфический антиген. Однако единого взгляда на конкретные механизмы развития дисрегуляции в иммунной системе при атопической астме до сих пор не существует. За прошедшие десятилетия в роли общепринятых выступали теории, признающие ведущую роль: нарушений регуляции В-лимфоцитов по Адо А.Д. [1]; нарушений супрессорной функции лимфоцитов [2]; нарушений баланса Th1 и Th2-лимфоцитов [3]. Но предполагалось, что в патогенезе нарушений иммунной системы при АБА важную роль играют и другие, еще не изученные подробно процессы. Например, интересно проследить характер активационного процесса в связи с количественными изменениями иммунокомпетентных клеток. Поддержание гомеостаза, в том числе и клеточного, является одним из основных свойств всего живого. Оно достигается сбалансированностью процессов клеточной пролиферации и клеточной гибели (апоптоза).

Изучению пролиферации лимфоцитов при АБА посвящены многие исследования. Но в последние два десятилетия обращают внимание на роль нарушения клиренса продуктов апоптоза при аллергических заболеваниях, в том числе при атопической бронхиальной астме [4]. Таким образом, используя представления об этом процессе, как считают исследователи, можно объяснить некоторые патогенетические аспекты развития аллергического процесса.

Аутофагия - эволюционно консервативный путь, создающий круговорота органелл и белков с помощью лизосомной обработки. Во время аутофагии образованные структуры с двойной мембраной, называемые аутофагосомами, инкапсулируют цитоплазматический материал, такой как дисфункциональные или поврежденные органеллы, белки или продукты апоптоза. Существует все больше доказательств того, что аутофагия также может влиять на патогенез и / или прогрессирование многих заболеваний человека [4], включая иммунные расстройства (астму) и хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ). Распознавание и удаление мертвых клеток – процесс, который должен протекать эффективно, без протекания аутоиммунных или воспалительных процессов [5]. Процесс аутофагии для утилизации поврежденных клеток может осу-

ществляться как соседними клетками, так и специализированными - моноцитами.

Цель работы - оценка морфологических особенностей моноцитов больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмы.

Моноциты - клетки врожденной иммунной системы, обладающие способностью фагоцитировать, продуцировать цитокины и представлять антигены. Для изучения биологических функций моноцитов в качестве диагностических и исследовательских целей в условиях культивирования *in vitro* стоит необходимость в получении высокого качества и количества исследуемых клеток. Мембранный белок CD 14 экспрессируется преимущественно на моноцитарных клетках, и служит основным маркером при определении моноцитов из общей фракции мононуклеарных клеток. Существует метод выделения моноцитов из периферической крови на градиенте плотности Фиколла, однако, при разделении в стандартном градиенте, лимфоциты и моноциты имеют близкие характеристики, в связи с чем, получить обогащенную фракцию моноцитов затруднительно. В нашей работе модифицирована методика выделения с достаточно высоким выходом моноцитов из общей фракции крови, на основе центрифугирования в оптимизированном градиенте плотности Перколл. Разделение двух типов клеток возможно благодаря разной чувствительности к осмотическому давлению. Лимфоциты более чувствительны к увеличению осмолярности, чем моноциты. Полученные данные показали, что чем выше осмолярность, тем выше чистота, но тем ниже выход моноцитов. Оптимальными условиями для выделения моноцитов из фракции мононуклеарных клеток, при которых происходит очистка и от тромбоцитов и от мертвых клеток, обладает 46% ISO-осмотический раствор Перколл. Использование ISO-осмотического градиента плотности Перколл позволило получить обогащенную фракцию моноцитов. Для снижения токсичности реагента Перколл и повышения жизнеспособности клеток, при разделении использовалась питательная среда RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки с сохранением 46% ISO-осмотической плотности. Питательная среда добавлялась к мононуклеарным клеткам, а так же в раствор Перколл, на который наслаивался образец. Для лучшей визуализации разделения фаз использовалась среда RPMI с феноловым красным и без фенолового красного.

Чистота и извлечение моноцитов составила около 70%, наличие белка CD 14, показанное методом проточной цитометрии подтвердило, что полученная фракция содержит моноциты (рис. 1).

При анализе физиологического состояния фракции моноцитов мы показали (рис.2), что во фракции моноцитов от здоровых доноров часть клеток находится в состоянии апоптоза (Q1,Q2), во фракции моноцитов больных тяжелой формой астмы увеличивается процент некротических клеток (Q3).

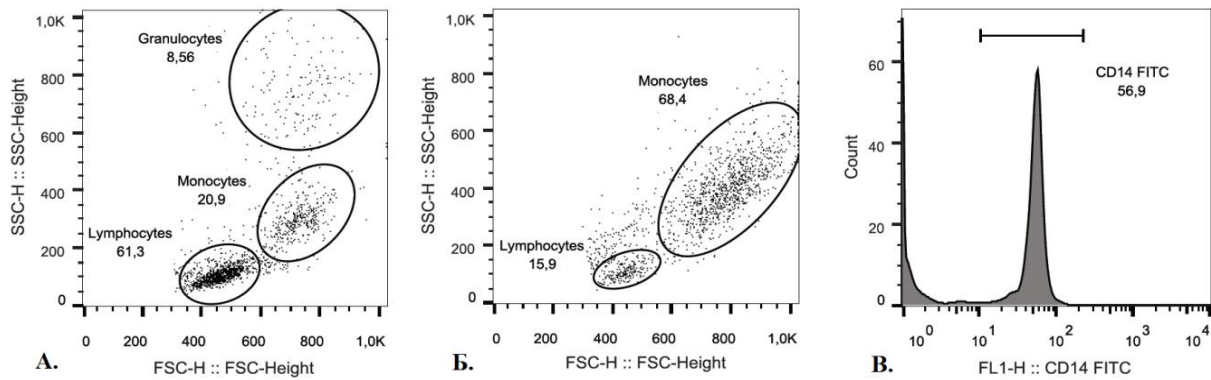


Рис. 1. Этапы выделения моноцитов: А - состав мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных на градиенте плотности Фиколла (моноцитов 20,9 %), Б - состав мононуклеарных клеток периферической крови, после очистки на градиенте плотности перколла (58,4%); В - Субпопуляция моноцитов, «окрашенная» CD14. Репрезентативный результат.

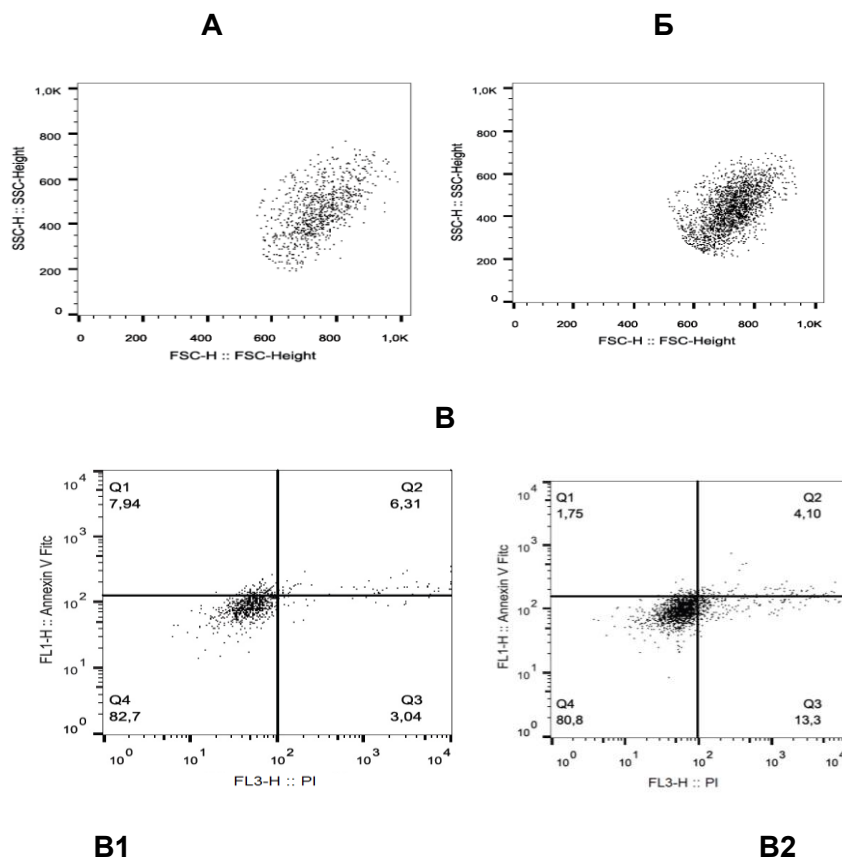
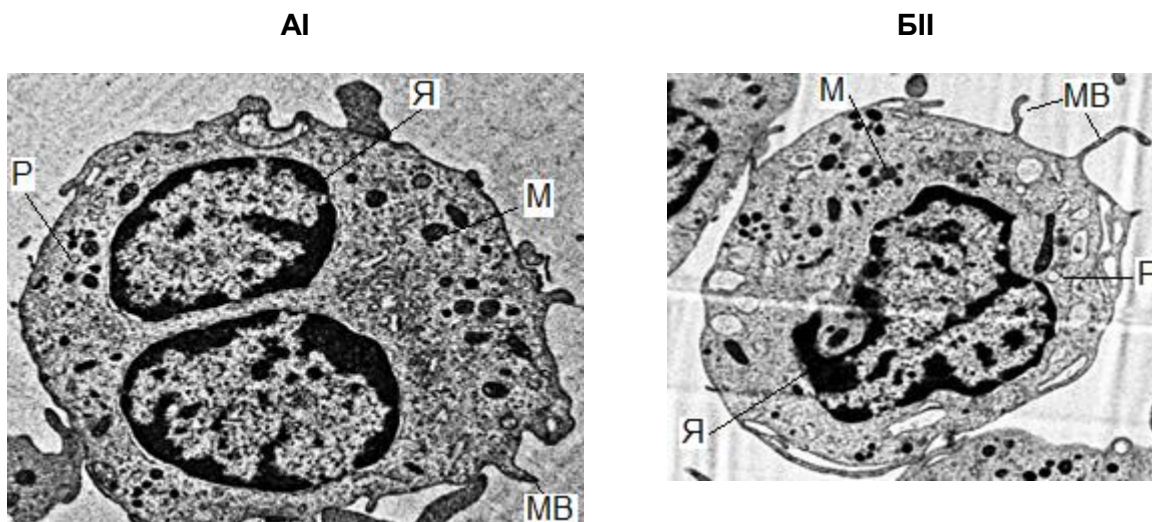
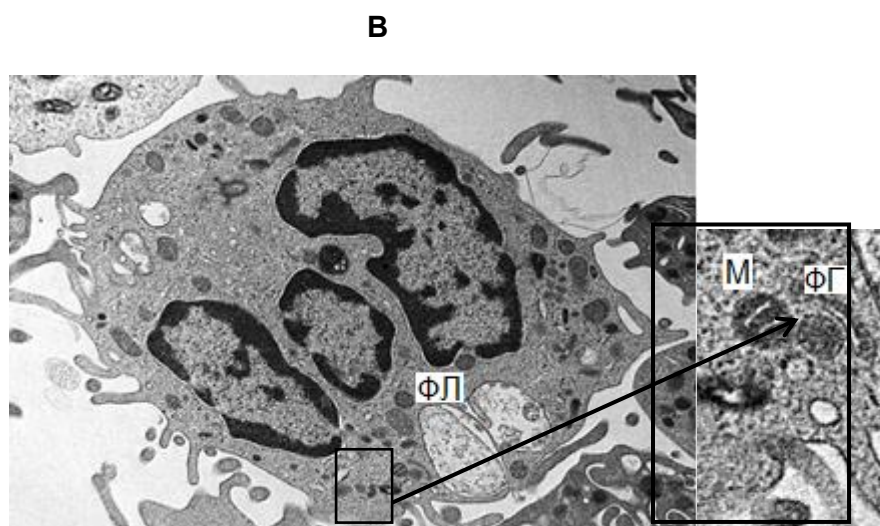


Рис.2. Отдельная популяция моноцитов (2000 событий): А - здоровых доноров и Б - больных тяжелой формой астмы. (В)- Оценка уровня апоптоза и некроза методом проточной цитометрии в моноцитах здоровых доноров (В1) и больных тяжелой формой астмы (В2). Окрашивание Annexin и PI. Репрезентативный результат.

Для оценки аутофагии в моноцитах мы использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии (Рис.3).

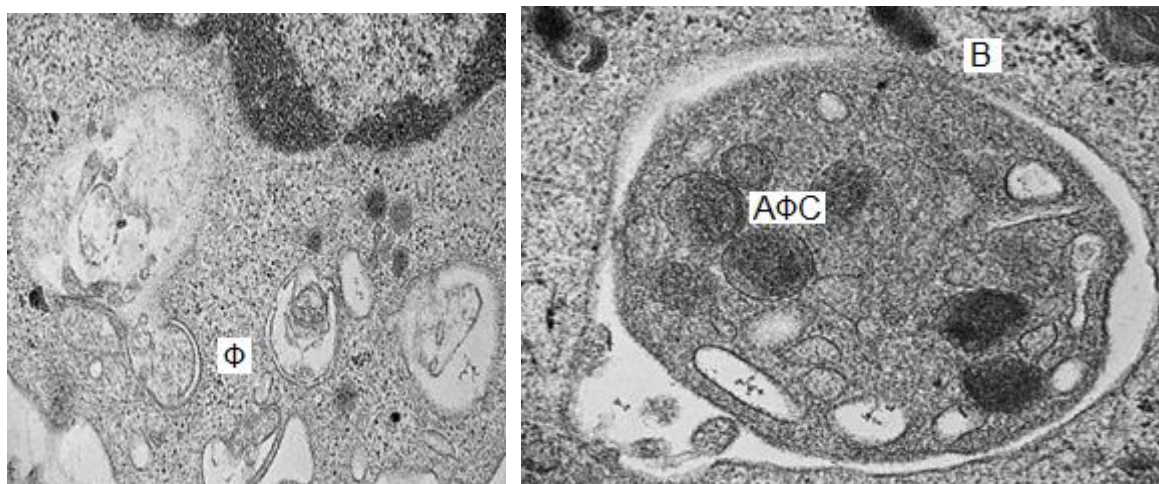


Изменение структуры моноцита в зависимости от тяжести atopической астмы; А.І – моноцит здоровых доноров; Б.ІІ – дифференцирующийся макрофаг больных тяжелой формой астмы. Я – ядро, Р – рибосомы, МВ – микроворсинки и складк, М-митохондрии.



Зрелый макрофаг фракции больных тяжелой формой астмы: ФЛ—фаголизосома; ФГ-фагофор-формирующаяся двойная мембрана аутофагосомы, М - митохондрии

Г



Г.І

Г.ІІ

Г.І- фрагмент цитоплазмы моноцита с формирующимися аутофагосомами (АФС): Г.ІІ – фрагмент цитоплазмы макрофага больных тяжелой астмой с вакуолями содержащими аутофагосомы (АФС). Ф - формирующаяся фагофора, АФС – аутофагосома.

Рис.3. Ультраструктура моноцитов здоровых доноров и больных тяжелой формой астмы.

В образцах здоровых доноров выявили классические признаки ультраструктуры моноцитов: ядра бобовидной, подковообразной, иногда дольчатой формы с выпуклостями и углублениями. Хроматин слабо конденсирован. В ядре гетерохроматин представлен зёрнами рассеянными ядру и, как правило, в больших количествах залегают под ядерной мембраной. В цитоплазме клеток определялось небольшое количество органелл: редкие округлые светлые митохондрии, немногочисленные удлинённые каналы ГЭР, лизосомы разных размеров с темным и светлым однородным содержимым, слабо развитый комплекс Гольджи, множество свободных рибосом и полисом (рис.3-А).

Моноциты образцов больных тяжелой формой астмы (рис.3-Б), в основном, представлены дифференцирующимися макрофагами: Форма всей клетки и ядра - неправильная. В ультраструктуре макрофага характерными элементами являются многочисленные вакуоли и лизосомы с мелкогранулярным содержимым, митохондрии и ЭПР. На поверхности клетки появляются длинные вытянутые отростки и удлинённые ядра с извилистыми неровными краями. Эухроматин в ядре распределяется равномерно, гетерохроматин выявляется по периферии кариолеммы в виде тонкого ободка.

Наряду с возрастанием в тканях числа юных макрофагов проявлялись ультраструктурные признаки усиления их белоксинтезирующей активности. Цитолемма у некоторых макрофагов формировала короткие утолщенные выросты и инвагинации, участвующие в захвате частиц биоматериала и образовании фагоцитарных вакуолей. Однако наряду с фагосомами мы обнаружили фагофоры и аутофагосомы (рис.3,В) - органеллы характерные для запуска процесса аутофагии в макрофагах. Во время аутофагии фагофора (двойная мембра - рис.3, В-вставка) инкапсулируют цитоплазматический материал, такой как дисфункциональные или поврежденные органеллы, белки или апоптотические тельца в фагосомы, образуют так называемые аутофагосомами (АФС). Затем аутофагосомы сливаются с лизосомами, ферменты которых деградируют цитоплазматический

материал. В последние десятилетия аутофагия стала фундаментальным процессом, связанным не только с тканевым и клеточным гомеостазом, существует все больше доказательств того, что аутофагия может влиять на патогенез и / или прогрессирование многих заболеваний человека [5]. Однако, наряду с канонической аутофагией существует еще один процесс, LAP-LC3-ассоциированная аутофагия, обеспечивающий клеткам избавление от потенциальных угроз и, тем самым, ее выживание. LAP был описан еще в 2007 году [6]. Это процесс, который инициирует поглощение проникающего патогена плазматической мембраной с образованием одномембранной фагосомы (Ф), после чего она «украшается» молекулами LC3 белком. Помимо бактериальных клеток также происходит распознавание апоптотических, некротических или энтотических [8]. Несмотря на совместное использование некоторых молекулярных механизмов, в настоящее время существует несколько различий, которые дифференцируют LAP от канонической аутофагии. В частности, два белка Rubicon и Nox2 присутствуют только при активации LAP, экспрессию которых мы обнаружили в лимфоцитах больных тяжелой формой астмы [8].

Мы предполагаем, что в моноцитах больных тяжелой атопической астмой развивается неканоническая аутофагия. Что является предметом дальнейшего изучения, т.к. по данным литературы, дефекты в LAP, а не канонической аутофагии, могут вызывать СКВ-подобные явления и могут способствовать патогенезу СКВ [7,9]

Литература

1. Адо А. Д. Патологическая физиология // М.: Триада-Х. 2000. С. 574.
2. Kay A. B. T cell as orchestration of the asthmatic response. // Ciba Found Symp. 1997. V. 206. P. 56-5.
3. Shirai T., Suzuki K., Inui N., Suda T., Chida K., Nakamura H. Th1/Th2 profile in peripheral blood in atopic cough and atopic asthma. // Clin. Exp. Allergy. 2003. V. 33. N. 4. P. 84-89. 4. Мамонтова Т. В. Атопическая бронхиальная астма и устойчивость к апоптозу // Актуальні проблеми сучасної медицини. 2008. Т. 8. № 4. С. 171.
4. Eskelinen E. L., Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. 2009. P. 664-673. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.014
5. Nagata S., Hanayama R., Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells // Cell. 2010. V. 140. P. 619–630.
6. Martinez J., Subbarao Malireddi R. K., Lu Q., Green D. R Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins // Nat Cell Biol. 2015. V. 17. N. 7. P. 893-906.
7. Martinez J., Cunha L. D., Park S., Green D. R. Noncanonical autophagy inhibits the auto-inflammatory, lupus-like response to dying cells // Nature. 2016. V. 5. N. 533(7601). P. 115–119.
8. Skibo Yu. V., Tikhomirova M. V., Abramov S. N., Analysis of the Expression of Key Protein Regulators of Apoptosis and Autophagy in T-Lymphocytes of Patients with Bronchial Asthma // Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta-Seriya estestvennye nauki. 2019. V.161. Is.4. P.505-520.

9. Heckmann B. L., Boada-Romero E., Cunha L. D., Magne J., Green D. R. LC3-Associated Phago-cytosis and Inflammation //J Mol Biol. 2017. V. 24. N. 429(23). P. 3561-3576. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.08.012. Epub 2017 Aug 25.

Features of cell death of monocytes in patients with atopic bronchial asthma

B. R. Ibragimov, Yu. V. Skibo, Z. I. Abramova

*Kazan Federal University
18 Kremlin street, 420008 Kazan, Republic of Tatarstan, Russia.*

Email: ibragimov94@inbox.ru

To assess the nature of programmed cell death, we used the method of transmission electron microscopy and found significant morphological differences - in patients with severe atopic bronchial asthma, macrophages with signs of autophagy are mainly found.

Keywords: apoptosis, canonical autophagy, Lap-associated phagocytosis, macrophages, atopic bronchial asthma.

Современные проблемы устранения микоплазменной контаминации клеточных линий эукариот в лабораторных условиях

© Г.А. Ивахова

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

Россия, 190013 г. Санкт-Петербург, Московский проспект, 26.

Email: biology.may20@gmail.com

Обзор включает в себя краткое изложение основных методов детекции и устранения микоплазменной контаминации в культивируемых клеточных линиях эукариот, применяемых в настоящее время. А также возникающие при этом проблемы, связанные с физиологией микоплазм.

Ключевые слова: микоплазма, клетка, контаминация, мембрана, среда, культивирование.

Контаминация клеточных культур микоплазмами является достаточно сложной и серьезной проблемой для научных исследований *in vitro*, поскольку микоплазмы оказывают действие на физиологию клеток и их метаболизм, а также могут подавлять пролиферативную активность, влиять на ДНК/РНК синтез в клетке, способствовать развитию дегенеративных процессов клеточной системы. Токсическое и гемолитическое действие на мембраны клеток оказывают продукты метаболизма микоплазм, например, такие как перекись водорода и супероксидные радикалы. Согласно открытым источникам, от 15% до 80% клеточных линий контаминированы микоплазмами. В связи с этим, безопасность производимых лекарственных препаратов, так же как и чистота любого эксперимента проводимого в лаборатории, является важной задачей для современной биотехнологии.

Микоплазмы - прокариоты класса *Mollicutes*, не имеют клеточной стенки и обладают малыми размерами. Мембрана большинства микоплазм содержит большое количество липопротеинов, предположительно заякоренных жирнокислотной частью, а полипептидная часть экспонирована снаружи мембраны. Микоплазмы являются самыми распространенными контаминантами клеточных культур, они тесно связаны с мембраной клетки хозяина, поэтому их еще называют «мембранными паразитами». Наиболее часто в клеточных культурах встречаются *M. hyorhinae*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. laidlawii*, *M. fermentans*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. pirum*. Для всех представителей этого класса выявлена характерная генетическая гетерогенность и выраженная нестабильность генома, следствием этого белковые профили, отражающие экспрессию генов, могут быть подвержены изменениям. Антигенное многообразие свидетельствует о высокой степени фенотипической изменчивости. Посттрансляционная модификация метаболических ферментов остается пока недостаточно исследованной. Стоит отметить, что некоторые микоплазмы способны проникать в клетки эукарион имея специальный аппарат инвазии. Например, *M. penetrans* при наличии фосфолипидной активности в своей мембране, способствующей локальному разрушению мембраны эукариотической клетки, обеспечивает проникновение микоплазмы внутрь клетки хозяина.

Источниками заражения клеточных культур могут быть компоненты питательных сред, сыворотки, трипсин, жидкий азот при хранении в криобанке, а также сотрудник лаборатории. Меры по предотвращению микоплазменной контаминации можно разделить на три категории: поддержание в чистоте оборудования используемого для культивирования, соблюдение техники безопасности при работе с культурами клеток и соблюдение протоколов асептики в лаборатории со стороны оператора.

На присутствие микоплазменной контаминации в клеточной культуре может указывать наличие зернистости, вакуолизации, образование многоядерных клеток, изменение митотической активности, гибель клеток, раннее отторжение от стекла с образованием дефектов монослоя, а также помутнение среды вследствие ее закисления. Однако не всегда при микоплазменном заражении возможно визуальное выявление. Особенности углеводородного обмена микоплазм разделяют их условно на два типа. Микоплазмы одного типа продуцируют кислоты из углеводов, понижая соответственно pH ростовой среды. Способны к сбраживанию глюкозы и лучше всего культивируются в средах с pH 8-8,5. Наличие аргининдигидролазного пути указывает на возможность гидролиза, обеспечивающего образование орнитина, АТФ, CO₂, а также аммония, и соответственно увеличение pH культуральной среды до щелочных значений. Присутствие аргининдигидролазного пути у другого типа микоплазм указывает на то, что при наличии в среде и глюкозы, и аргинина, образующиеся при гликолизе кислоты могут маскировать защелачивание, вызванное высвобождением аммония при деградации аргинина. Таким образом, при проверке среды на наличие микоплазм с помощью определения pH и её оптической плотности, подобные явления могут исказить результат.

В настоящее время, детекция микоплазменной контаминации изложена в XIV издании Государственной Фармакопеи (ОФС.1.7.2.0031.15 «Испытание на присутствие микоплазм»), Европейской Фармакопеи (раздел 2.6.7.) и Фармакопеи США (раздел 63). Требование к чувствительности метода детекции установлено в пределах 10-100 КОЕ/мл. Методы обнаружения микоплазм принято делить на прямые и косвенные. Прямые методы: выращивание колоний микоплазм на определенной питательной среде (рекомендуемые среды – Хейфлика, Фрея, Фрисая), окрашивание исследуемой клеточной культуры на ДНК микоплазм. Косвенные: иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ, ПЦР, и другие.

«Золотым стандартом» обнаружения микоплазмы в культуре является микробиологический (культуральный) метод, состоящий в культивировании исследуемого образца на селективных жидких и агаровых питательных средах при условиях наиболее благоприятных для роста и развития соответствующих видов микоплазм. В РФ в настоящее время рекомендовано испытание на присутствие микоплазм используя питательную среду, чувствительность которой определяют с помощью тест-штамма *M. arginini* G230, как наиболее часто встречающегося контаминанта клеточных культур. Среду используют полужидкую Каган.

Цитохимический метод для контроля присутствия микоплазм в культуре позволяет выявить трудно культивируемые виды данных бактерий. Он состоит из нескольких этапов, включающих получения монослоя клеточной культуры, чувствительной к микоплазмам, фиксирование, затем окрашивание специфическим флуоресцирующим красителем ДНК и визуализацию при помощи люминесцентного микроскопа.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляет собой многократное увеличение части генома используя определенные праймеры с последующей детекцией различными способами (например с помощью электрофореза). ПЦР тест основан на детекции 16S рРНК для наиболее распространенных видов микоплазм. В случае использования ПЦР метода, заявленный предел обнаружения считается 1-10 копий генов микоплазмы на 1 мкл образца, но недостаточно определенным будет соотношение

числа копий ДНК в пробе и КОЕ микоплазмы в 1 мл первоначального образца. Кроме этого, сложно учесть влияние состава пробы – составляющих питательной среды и самих клеток, как живых, так и мертвых. Несмотря на то, что ПЦР тест является высокоспецифичным и чувствительным, на него требуется затраты по времени, и может не оказаться в результате различия между живыми клетками и мертвыми или среды загрязнения.

Окрашивание Hoescht может быть выполнено быстро и позволяет напрямую визуализировать клетки, зараженные микоплазмой. Однако оно отобразит всю клеточную ДНК, без разделения на ДНК микоплазмы и клетки-хозяина. Стоит отметить метод ELISA – быстрый и относительно простой способ, используется для определения антител микоплазмы в культивируемых клетках, но его недостаток заключается в способности обнаружить только ограниченный перечень видов микоплазм. В случае использования моноклональных антител, выявление микоплазм ограничено интенсивным темпом изменения поверхностных антигенов. Одним из новых подходов по обнаружению микоплазм является использование аптамеров - молекул одноцепочечной ДНК или РНК размером ориентировочно 20-60 нуклеотидов. С помощью процедуры Cell-SELEX можно отбирать аптамеры на специфические белковые маркеры, расположенные на поверхности мембран микоплазм. Также как и белковые антитела, аптамеры могут формировать строго определенную пространственную конформацию и узнавать свои цели с высокой степенью аффинности и специфичности, а также распознавать различные структурные состояния одного и того же белка. Одним из основных недостатков этого метода является быстрая деградация аптамеров нуклеазами, которые могут содержаться в питательных средах, а также возможное проявление кросс-реактивности аптамера при связывании с некоторыми другими структурно родственными молекулами. При использовании аптамеров в качестве метода обнаружения микоплазм, данная процедура может занять в целом примерно 30 минут, используя проточный цитометр, флуоресцентный микроскоп или считыватель микропланшетов.

Если клеточная линия является редкой или ценной, рекомендуется попытаться устранить заражение, в ином случае, лучше полностью утилизировать контаминированные клетки. Фактически, устранение микоплазм с помощью антибиотиков практически невозможно, учитывая, что некоторые виды могут проникать внутрь клетки-хозяина. В настоящее время существуют различные подходы к попытке удаления микоплазмы из клеточной культуры: физические (автоклавирование), химические (обработка детергентом), иммунологические (антисыворотки, специфичные для микоплазм), химиотерапевтические (использование антибиотиков). Однако ни один из этих методов не является на 100% эффективным и подходящим ко всем видам микоплазм, но наиболее надежным из вышеперечисленных способов является использование антибиотиков.

Ввиду биологических особенностей микоплазм, неэффективными считаются препараты ряда сульфонамидов, триметоприма, рифампина, полимиксинов, линезолида и др. Напротив, тетрациклины, фторхинолоны и макролиды проявляют активность против микоплазм. Действие тетрациклинов основано на обратимом связывании с 30S субъединицей рибосомы и предотвращением синтеза белка. У макролидов связывание происходит с 50S субъединицей рибосомы, что приводит к блокированию синтеза пептидной цепи. Фторхинолоны действуют на связывание ДНК-гиразы и/или ДНК-топоизомеразы IV, в результате чего происходит подавление репликации ДНК. Использование только одного антибиотика скорее всего приведет к появлению устойчивости к нему. Считается, что эффективность использования антибиотиков против микоплазм составляет 66-85%.

Анализ литературы по проблеме микоплазменной контаминации клеточных культур позволяет сделать вывод о том, что применяемые методики наиболее эффективны при их комбинировании, учитывая особенности строения и функционирования мико-

плазм. Можно предположить, что решить проблему устранения микоплазменной контаминации можно будет изучив молекулярно-генетические механизмы адаптации микоплазм к стрессовым условиям, определяющих их выживание.

Литература

1. Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика // Спб. Изд. Наука. 2002. С. 2-136.
2. Laleh Nikfarjam, Parvaneh Farzaneh Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture // Cell Journal (Yakhteh). Vol 13. No 4. 2012. P. 203-212.
3. Шалунова Н. В., Волкова Р. А., Волгин А. Р., Петручук Е. М., Бердникова З. Е., Эльберт Е. В., Шевцов В. А., Рукавишников А. В., Семенова И. С., Меркулова О. В., Трусов Г. А., Терешкина Н. В., Рачинская О. А., Индикова И. Н., Лебединская Е. В., Мыца Е. Д. Микоплазмы - контаминанты клеточных культур // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016. Т. 16. № 3. С. 151-160.
4. Катола В. М. Микоплазмы: биология, распространение и роль в патологии // Бюллетень Инст. Геол. и Природ. Вып. 69. 2018. С. 50-54. DOI: 10.12737/article_5b975abf813ab8.91657125
5. Суханова С. М., Бердникова З. Е., Тихонова А. С. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2019. Т. 19. № 3. С. 161-168.
6. Quanyuan Wan, Xiaohui Liu, Zihua Zeng, Zhenghu Chen, Yanting Liu and Youli Zu Aptamer Cocktail to Detect Multiple Species of Mycoplasma in Cell Culture // Int. J. Mol. Sci. 2020. 21. P. 3784; doi:10.3390/ijms21113784
7. Лахин А. В., Тарантул В. З., Генинг Л. В. Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы // ACTA NATURAE | Т. 5. № 4 (19). 2013. С. 37-48.
8. Yanting Liu, Wenqi Jiang, Shuanghui Yang, Jianzhong Hu, Wei Han, Jianguo Wen, Zihua Zeng, Jianjun Qi, Ling Xu, Haijun Zhou, Hongguang Sun, Youli Zu Rapid Detection of Mycoplasma-Infected Cells by an ssDNA Aptamer Probe // ACS Sens. 2019. 4. P. 2028–2038. DOI: 10.1021/acssensors.9b00582.
9. Чернова О. А., Медведева Е. С., Музыкантов А. А., Баранова Н. Б., Чернов В. М. Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур // ACTA NATURAE | Т. 8. № 2 (29). 2016. С. 27-38.
10. Глинских Н. П., Бахарев А. А., Устьянцев П. В., Устьянцев И. В. Использование криобанков клеточных культур в вирусологии и биотехнологии // Ветеринарная патология. 2007. № 4. С. 209-211.

Current problems with elimination of mycoplasma contamination of eukaryotic cell lines in laboratory conditions

G. A. Ivakhova

*Saint-Petersburg State Institute of Technology
Russia, 190013 Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26.*

Email: biology.may20@gmail.com

The overview includes short summary of basic methods for mycoplasma contamination detection and elimination in culturing eukaryotic cell lines currently applied, and also arised problems associated with mycoplasmas physiology.

Keywords: mycoplasma, cell, contamination, membrane, medium, culturing.

Роль генов регуляции синаптической пластичности в формировании особенностей пространственного мышления человека

© Казанцева А.В.^{1,2*}, Еникеева Р.Ф.^{1,2}, Давыдова Ю.Д.¹, Мустафин Р.Н.³, Тахирова З.Р.², Лобаскова М.М.⁴, Гарданова Л.Т.⁵, Федореева К.С.⁵, Малых С.Б.⁴, Хуснутдинова Э. К.^{1,3}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
450054 г. Уфа, проспект Октября, 71 лит. Е.

²Российская академия образования, Центр междисциплинарных исследований в сфере наук об образовании
119121 г. Москва, ул. Погодинская, 8.

³Башкирский государственный медицинский университет
450008 г. Уфа, ул. Ленина, 3.

⁴Психологический институт Российской академии образования
125009 г. Москва, ул. Моховая, 9/4.

⁵Башкирский государственный университет
450076 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.

*Email: Kazantsa@mail.ru

В результате оценки основного эффекта полиморфных вариантов генов регуляции синаптической пластичности (*NGF*, *NRXN1*, *KIBRA*, *NRG1*, *BDNF*, *GRIN2B*, *APOE*, *SNAP25*) и эффекта ген-средовых взаимодействий в формирование индивидуальных особенностей пространственного мышления была продемонстрирована ассоциация аллеля Т полиморфного локуса rs17070145 в гене *KIBRA* с более высоким уровнем пространственного мышления ($\beta = 1.32$; $P = 0.003$; $P_{FDR} = 0.037$) по сравнению с носителями генотипа rs17070145*CC у индивидов без когнитивных нарушений при коррекции на наличие «рискового» аллеля *APOE* $\epsilon 4$. Были выявлены модели ген-средовых взаимодействий, детерминирующие межиндивидуальную вариативность в пространственных способностях, включающие табакокурение и локус rs17070145 в гене *KIBRA* ($\beta = 3.74$; $P = 0.010$); место воспитания в детстве и варианты гена *APOE* ($\beta = -6.94$; $P = 0.0002$).

Ключевые слова: *KIBRA*; аполиipoprotein E; когнитивные способности; мысленное вращение предметов; линейная регрессия; ген-средовые взаимодействия.

В настоящее время индивидуальная успешность в STEM-областях (от англ. Science, Technology, Engineering, Mathematics) в большей мере связана с уровнем развития особенностей пространственного мышления, позволяющих эффективно оперировать пространственными отношениями, ориентироваться в пространстве и воспринимать перспективу, а также с успешным обучением в школе по естественнонаучным дисциплинам. Таким образом, возникает необходимость разработки методов оценки про-

странственных способностей, основанных на молекулярно-генетических, эпигенетических и социальных предикторах.

Согласно результатам близнецовых исследований, индивидуальные различия в особенностях пространственного мышления опосредованы комплексными механизмами, среди которых важная роль принадлежит взаимодействию генетического и средового компонента. В частности, особенности когнитивного функционирования могут быть обусловлены особенностями функционирования генов, участвующих в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности, включая гены нейротрофических факторов головного мозга (*BDNF*, *NGF*), нейрексина 1 (*NRXN1*), нейрегулина 1 (*NRG1*), синаптосомально-ассоциированного белка (*SNAP25*), глутаматергического рецептора (*GRIN2B*) (Казанцева и др., 2020; Mustafin et al., 2020). Помимо генно-кандидатного подхода, использованный Parassotiroopoulos с коллегами (2006) полногеномный анализ ассоциаций (GWAS) позволил идентифицировать полиморфный локус rs17070145, локализованный в интроне 9 гена *KIBRA* (Kidney and BRAin expressed protein) и ассоциированный с эпизодической памятью. Необходимо отметить, что ранее была показана необходимость включения индивидуального варианта в гене аполипопротеина E (*APOE*) (в частности, ϵ 4-аллеля) в качестве ковариаты при оценке генетического эффекта на снижение когнитивного функционирования (Sasayama et al., 2020). Поскольку к настоящему времени число исследований, включающих анализ генов регуляции синаптической пластичности при изучении особенностей формирования пространственного мышления у здоровых людей без когнитивного дефицита, немногочисленно, мы предположили, что такие гены могут быть связаны не только с когнитивными нарушениями, но и с когнитивными способностями у здоровых индивидов.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования являлась оценка основного эффекта полиморфных вариантов генов регуляции синаптической пластичности и гена *APOE*, а также эффекта ген-средовых взаимодействий в формирование особенностей пространственного мышления у индивидов без когнитивных нарушений.

В качестве материала в настоящем исследовании использовалась ДНК 1011 индивидов без когнитивных нарушений (80% женщин) в возрасте 18-25 лет (средний возраст: 19.79 ± 1.69 лет) – студентов ВУЗов РФ разной этнической принадлежности (535 русских, 231 татар, 160 удмуртов, 85 индивидов смешанной этнической принадлежности). Включенные в исследование индивиды не состояли на учёте у психиатра и нарколога. Оценка пространственных способностей проводилась с помощью батареи тестовых заданий, оцениваемых как число правильных ответов при ответе на вопросы о вращении 3D фигур («shape rotation»), и реализованной в цифровом формате на психодиагностической платформе Российской академии образования. У всех индивидов была собрана информация социального характера, включающая этническую принадлежность до трёх поколений, особенности детско-родительских отношений (стиль родительского воспитания, эпизоды плохого обращения в детстве, воспитание в полной/неполной семье), уровень доходов семьи, возраст матери и отца при рождении ребёнка, вес ребёнка при рождении, место воспитания, число детей в семье и порядок рождения, знание своего родного языка (билингвизм), наличие хронических заболеваний и табакокурения. Все участники заполнили добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

Для молекулярно-генетического анализа полиморфных локусов была использована ДНК, выделенная методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование 10 полиморфных локусов генов *NGF* (rs6330), *NRXN1* (rs1045881, rs4971648), *KIBRA* (rs17070145), *NRG1* (rs6994992), *BDNF* (rs6265), *GRIN2B* (rs3764030), *APOE* (rs7412, rs429358), *SNAP25* (rs363050) проводилось методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов (LGC Genomics, UK) на амплификаторе «CFX96»

(BioRad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке. Генотипы в гене *APOE* были сгруппированы на основании наличия аллелей $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$.

Статистическая обработка результатов включала линейный регрессионный анализ с включением половой, этнической принадлежности и наличия «рискового» аллеля *APOE* $\epsilon 4$ в качестве ковариат с использованием аддитивной, доминантной и рецессивной статистических моделей (PLINK v.1.09). Оценка эффекта ген-средовых взаимодействий была осуществлена с помощью множественного линейного регрессионного анализа, в котором в качестве независимых переменных выступали полиморфные локусы, социальные факторы, половая и этническая принадлежность, в то время как уровень пространственного мышления – в качестве зависимой переменной. Стратификационный анализ был проведен с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (SPSS 23). Процедура FDR (False Discovery Rate) была использована для коррекции на множественность сравнений (PLINK v.1.09).

В результате статистической обработки результатов, оценивавшей эффект десяти изученных полиморфных локусов генов регуляции синаптической пластичности с включением половой, этнической принадлежности и наличия «рискового» аллеля *APOE* $\epsilon 4$ в качестве ковариат, в аддитивной модели была обнаружена ассоциация аллеля Т полиморфного локуса rs17070145 в гене *KIBRA* с более высоким уровнем пространственного мышления ($\beta = 1.32$; $P = 0.003$; $P_{FDR} = 0.037$) по сравнению с носителями генотипа rs17070145*CC.

Вторым этапом обработки результатов являлась оценка эффекта ген-средовых взаимодействий, учитывающего, наряду с генетическими вариантами, вовлеченность различных социальных параметров. Таким образом, было показано, что табакокурение модулирует ассоциацию локуса rs17070145 в гене *KIBRA* с индивидуальными различиями в пространственных способностях ($\beta = 3.74$; $P = 0.010$). В частности, более высокий уровень пространственного мышления статистически значимо более характерен для носителей минорного аллеля Т локуса rs17070145, заявивших о табакокурении, по сравнению с теми, кто отрицал у себя наличие такого поведения ($\beta = 4.59$; $P_{FDR} = 0.004$). Кроме того, модель, включающая в себя варианты гена *APOE* и место воспитания в детстве, также достигла уровня статистической значимости ($\beta = -6.94$; $P = 0.0002$). Причем, наилучший уровень пространственных способностей был обнаружен у носителей «благоприятного» аллеля *APOE* $\epsilon 2$, воспитанных в сельской местности, по сравнению с теми, кто провел свое детство в городских условиях ($\beta = -6.04$; $r^2 = 0.06$; $P_{FDR} = 0.021$). Таким образом, на основании полученных нами данных, можно предположить неблагоприятный эффект воспитания в городской местности, который проявляется даже в случае наличия «благоприятного» аллеля *APOE* $\epsilon 2$, связанного с увеличением нейрональной активности (Davis et al., 2020).

Согласно ранее опубликованным данным, полиморфный локус rs17070145 в гене *KIBRA* является функционально-значимым, поскольку была показана связь мажорного аллеля С со снижением объема серого вещества в некоторых отделах головного мозга по сравнению с носителями генотипа rs17070145*ТТ как у лиц зрелого возраста (Li et al., 2020), так и у более молодых индивидов (Wang et al., 2013). Таким образом, идентифицированный в нашем исследовании эффект минорного аллеля Т в гене *KIBRA* на улучшение пространственного мышления согласуется с вышеуказанными работами, демонстрирующими ухудшение когнитивного функционирования у носителей мажорного аллеля С в этом локусе. Нашей исследовательской группой также был выявлен эффект ген-средового взаимодействия, включающий вариант гена *KIBRA* и табакокурение. В опубликованных источниках также есть свидетельства о совместной вовлеченности никотина и гена *KIBRA* в формирование когнитивного функционирования. В частности, меньшее количество постоянных ошибок в когнитивных тестах наблюда-

лось у лиц с никотиновой зависимостью по сравнению с теми, кто злоупотреблял табакокурением в прошлом, но только при наличии у них аллеля rs17070145*Т в гене *KIBRA* (Zhang et al., 2009). Примечательно, что в нашем исследовании также была обнаружена ассоциация минорного аллеля Т с более высокими способностями к мысленному вращению предметов, которая наблюдалась у индивидов, заявивших о табакокурении, по сравнению с теми, кто отрицал у себя наличие такого поведения.

Полученные нами данные свидетельствуют об основном эффекте генов *KIBRA* (на уровне полиморфных вариантов rs17070145) и *APOE* на формирование особенностей пространственного мышления у индивидов без когнитивных нарушений. Причем, наличие табакокурения и особенности места воспитания у респондентов оказывали позитивный модулирующий эффект на улучшение изученных когнитивных способностей у носителей минорного аллеля Т в гене *KIBRA* и ε2 в гене *APOE*, соответственно.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№АААА-А21-121011990119-1). Образцы ДНК взяты из ЦКП “Коллекция биологических материалов человека” ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Литература

1. Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Романова А.Р., и др. Взаимосвязь стресс-обусловленного когнитивного функционирования с вариантами генов регуляции синаптической пластичности // Генетика. 2020. Т. 56. № 1. С. 98-106.
2. Mustafin R.N., Kazantseva A.V., Malykh S.B. Khusnutdinova E.K. Genetic mechanisms of cognitive development // Russian Journal of Genetics. 2020. V. 56(8). P. 891-902.
3. Sasayama D., Hattori K., Yokota Y. et al. Increased apolipoprotein E and decreased TNF-α in the cerebrospinal fluid of nondemented APOE-ε4 carriers // Neuropsychopharmacol. Rep. 2020. V. 40(2). P. 201-205.
4. Papassotiropoulos A., Stephan D.A., Huentelman M.J. et al. Common Kibra alleles are associated with human memory performance // Science. 2006. V. 314. P. 475–478.
5. Li R., Wan W., Li J. KIBRA polymorphism modulates gray matter volume to influence cognitive ability in the elderly // Brain Imaging Behav. 2020. V. 14(5). P. 1388-1394.
6. Wang D., Liu B., Qin W., Wang J., Zhang Y., Jiang T., Yu C. KIBRA gene variants are associated with synchronization within the default-mode and executive control networks // Neuroimage. 2013. V. 69. P. 213-222.
7. Zhang H., Kranzler H.R., Poling J., Gruen J.R., Gelernter J. Cognitive flexibility is associated with KIBRA variant and modulated by recent tobacco use // Neuropsychopharmacology. 2009. V. 34(12). P. 2508-2516.

The role of synaptic plasticity genes in individual variance in spatial ability in humans

A.V. Kazantseva^{1,2*}, R.F. Enikeeva^{1,2}, Yu. D. Davydova¹, R.N. Mustafin³, Z.R. Takhirova², M.M. Lobaskova⁴, L.T. Gardanova⁵, K.S. Fedoreeva⁵, S.B. Malykh⁴, E.K. Khusnutdinova^{1,3}

¹*Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences*

71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

²*Russian Academy of Education, Centre of interdisciplinary research in education*
8 Pogodinskaya Street, 119121 Moscow, Russia.

³*Bashkir State Medical University*
3 Lenin Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

⁴*Psychological Institute of Russian Academy of Education*
9/4 Mokhovaya Street, 125009 Moscow, Russia.

⁵*Bashkir State University*
32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Russia.

**Email: Kazantsa@mail.ru*

Conducted statistical analysis aimed to examine the main effect of synaptic plasticity gene polymorphisms including the *NGF*, *NRXN1*, *KIBRA*, *NRG1*, *BDNF*, *GRIN2B*, *APOE*, and *SNAP25* genes, and gene-environment interactions effect in individual differences in spatial abilities made it possible to identify the association of the *KIBRA* rs17070145 T-allele and higher mental rotation ($\beta = 1.32$; $P = 0.003$; $P_{FDR} = 0.037$) compared to rs17070145 CC-genotype carriers without cognitive impairments while controlling for the “risky” *APOE* $\epsilon 4$ -allele. The gene-environment interaction models, which determined individual variance in spatial ability, were observed. They included present smoking and *KIBRA* rs17070145 ($\beta = 3.74$; $P = 0.010$); as well as place of residence in childhood and *APOE* variants ($\beta = -6.94$; $P = 0.0002$).

Keywords: *KIBRA*, apolipoprotein E, cognitive abilities, mental rotation, linear regression, gene-environment interactions.

Ответные реакции растений картофеля при обработке смесями бактерий *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами в условиях водного дефицита и вирусного заражения

© Ж. Н. Калацкая^{1*}, Е. Л. Недведь¹, Н. В. Балюк¹, К. М. Герасимович¹, Е. И. Рыбинская¹, И. А. Овчинников¹, Н. А. Копылова¹, Л. Г. Яруллина², Н. А. Ламан¹

¹Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072 г. Минск, улица Академическая, 27.

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

*Email: kalatskayaj@mail.ru

Обработка смесями *Bacillus subtilis* 47 с МеЖ или с СК+МеЖ, зараженных Y-вирусом растений картофеля и выращиваемых в условиях водного дефицита, способствует активному росту растений в сравнении с инфицированными и снижению вирусной нагрузки на 16% и 12% соответственно. При этом выявлено увеличение содержания пролина и общей пероксидазной активности в листьях растений. Применение *B. subtilis* отдельно или с СК не вызвало положительного эффекта по снижению инфицирования или сохранению роста растений в условиях недостаточного влагообеспечения.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., *Bacillus subtilis* 47, салициловая кислота (СК), метилжасмонат (МеЖ), Y вирус картофеля, пролин, пероксидаза

Картофель занимает одно из лидирующих мест в мировом валовом производстве. По официальным данным FAOSTAT мировой урожай данной культуры в 2019 году составил свыше 370 млн метрических тонн, а общая посевная площадь, отводимая под картофель, насчитывала 17,34 млн гектаров [1]. Повсеместно наблюдаемые ухудшения влагообеспечения почвы, связанные с уменьшением и неравномерностью выпадения осадков в сочетании с повышенным температурным режимом, являются существенным лимитирующим фактором роста и развития растений картофеля и формирования урожая клубней [2,3]. Кроме того, ослабленные растения более уязвимы для различных фитопатогенов. Так, например, широко распространённый Y вирус картофеля, может вызывать снижение урожайности культуры более чем на 50% [4].

Одним из решений экологически безопасного повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды и вирусным заболеваниям является применение бактерий рода *Bacillus*, способных индуцировать устойчивость к широкому кругу стрессоров [5-9]. Защитный спектр бактерий рода *Bacillus* можно значительно расширить, комбинируя их с сигнальными молекулами, например, с жасмоновой или салициловой кислотами. Однако научные публикации содержат противоречивые сведения о взаимодействии этих молекул и их сигнальных путей при комплексном действии неблагоприятных факторов различной природы [5, 8-10].

Целью работы являлось изучение ответных реакций растений картофеля к совместному действию дефицита почвенной влаги и заражению Y-вирусом при обработке растений смесями бактерий *Bacillus subtilis* с салициловой кислотой и/или метилжасмонатом.

Опыты проведены в контролируемых лабораторных условиях на микроклонально размноженных растениях картофеля белорусской селекции сорта Бриз. Адаптацию растений-регенерантов осуществляли на почвогрунте на основе верхового торфа с добавлением элементов питания в виде минеральных солей. Адаптированные растения обрабатывали путем опрыскивания листовой поверхности различными вариантами смесей бактерий *Bacillus subtilis* 47 (биопрепарат Карфил, производство Институт микробиологии НАН Беларуси) в концентрации 1×10^7 КОЕ с метиловым эфиром жасмоновой кислоты (МеЖ) – 1×10^{-7} моль/л и/или салициловой кислотой (СК) – 1×10^{-6} моль/л). Заражение Y- вирусом картофеля (YBK) проводили путём натирания клеточным соком доноров листьев растений картофеля при помощи мелкозернистой наждачной бумаги через 3 суток после обработки. Моделирование условий почвенной засухи начинали через неделю после обработки растений и продолжали в течение 2-х недель до появления симптомов повреждений на листьях. Влажность почвогрунта в опытном варианте (40-45% от полной влагоёмкости (ПВ)) достигалась снижением полива растений. Степень заражения картофеля Y- вирусом определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции [11]. Пробы отбирали через 14 дней после инфицирования. Содержание пролина определяли по методу Bates с соавт. [12], общую активность растворимой пероксидазы по Бояркину [13], используя в качестве хромогенного субстрата бензидин. Анализ состава и содержания веществ фенольной природы проводили методом ВЭЖХ (в настоящей статье данные не приводятся в связи с неполной идентификацией индивидуальных соединений). Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами, на диаграммах указаны средние значения с отклонениями, указывающими величину стандартной ошибки средней арифметической.

В условиях водного дефицита обработка растений *B. subtilis* не способствовала уменьшению заражения листьев картофеля, однако при использовании смесей бактерий с МеЖ и МеЖ+СК выявлено снижение уровня инфицирования на 16% и 12% соответственно (Рис. 1).

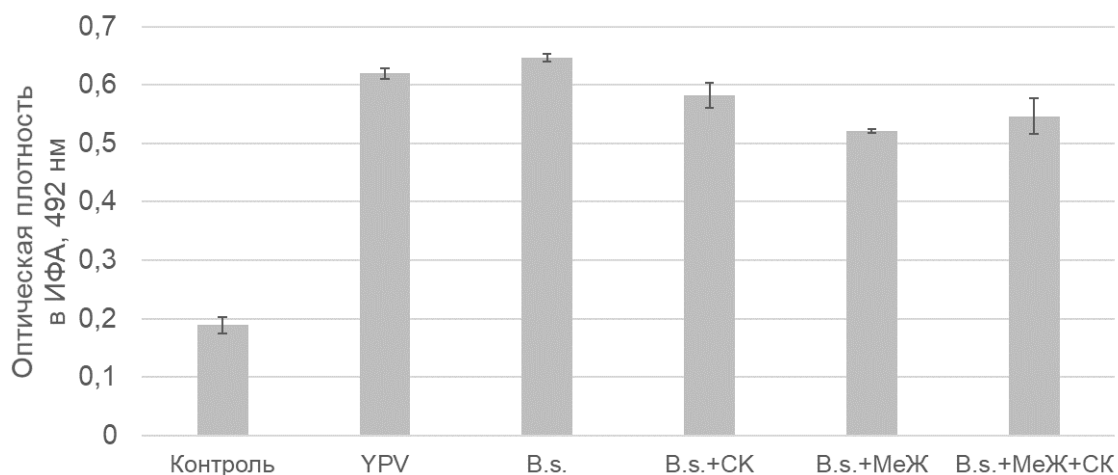


Рис. 1. Оптическая плотность в ИФА зараженных Y-вирусом листьев растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, выращиваемых в условиях водного дефицита

Инфицирование вызвало торможение роста побегов и снижение их длины по сравнению с контролем на 23,2%. Применение *B. subtilis* в смеси с МеЖ способствовало сохранению роста, а смесь *B. subtilis* с МеЖ + СК ускоряла рост, длина побегов увеличилась на 14,3% по сравнению с контрольными растениями, выращиваемыми при водном дефиците (Рис. 2).

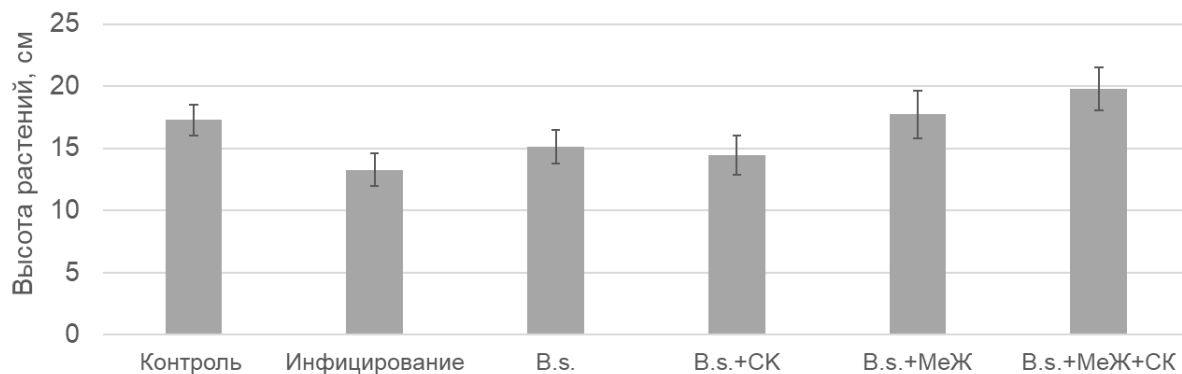


Рис. 2. Высота растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, зараженных Y-вирусом и выращиваемых в условиях водного дефицита

Заражение растений Y-вирусом на фоне водного дефицита привело к снижению содержания пролина. Максимальное накопление пролина на 89% по отношению к здоровым растениям и практически в 3 раза по отношению к инфицированным отмечено в варианте обработки смесью *B.subtilis* + СК. Опрыскивание комплексом *B.subtilis* с СК и МеЖ способствовало увеличению пролина на 39% по отношению к здоровым растениям и в 2,2 раза к инфицированным. При обработках *B.subtilis* и *B.subtilis* + МеЖ содержание пролина оставалось на уровне незараженных растений (Рис. 3).

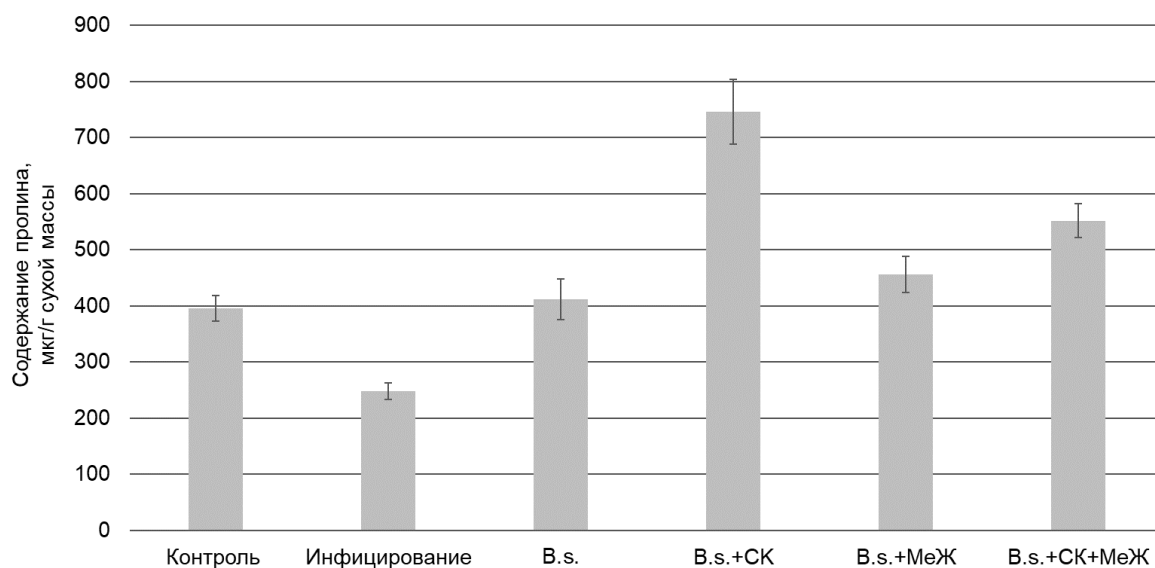


Рис. 3. Содержание пролина в листьях растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, зараженных Y-вирусом и выращиваемых в условиях водного дефицита

Заражение Y-вирусом вызвало увеличение общей пероксидазной активности практически в 2 раза в листьях контрольных растений, а применение смесей *B.subtilis* + МеЖ и *B.subtilis* с СК и МеЖ способствовало увеличению активности по сравнению с инфицированным контролем на 27,3 и 36,1% соответственно (Рис. 4).

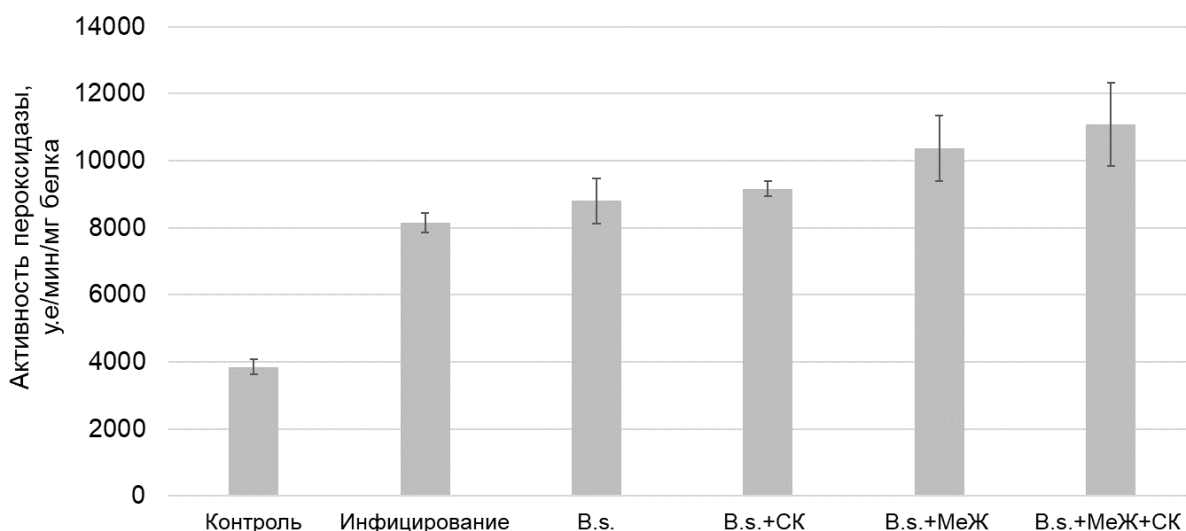


Рис. 4. Общая пероксидазная активность в листьях растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, зараженных Y-вирусом и выращиваемых в условиях водного дефицита

При водном дефиците и заражении Y-вирусом общее содержание фенольных соединений в вариантах опыта оставалось практически одинаковым, однако применение *B. subtilis* и смеси *B. subtilis* с СК вызвали значительные изменения в накоплении отдельных индивидуальных соединений. Так, выявлено увеличение содержания хлорогеновой, кофейной, феруловой, салициловой кислот и рутина.

Таким образом установлено, что обработка смесями *B.subtilis* + МеЖ и *B.subtilis* с СК + МеЖ, зараженных Y-вирусом растений картофеля и выращиваемых в условиях водного дефицита, способствует активному росту в сравнении с инфицированными растениями и снижению вирусной нагрузки на 16% и 12% соответственно. При этом выявлено увеличение содержания пролина и общей пероксидазной активности в листьях растений. Известно положительное влияние жасмонатов в формировании устойчивости к неблагоприятным факторам различной природы (действие засухи и грибной инфекции) [14]. Применение *B.subtilis* отдельно или в смеси с СК не вызвало положительного эффекта по снижению степени инфицирования или сохранению роста растений в условиях недостаточного влагообеспечения, однако в данных вариантах зарегистрировано значительное изменение содержания накопления индивидуальных фенольных соединений, высокое содержание эндогенной салициловой кислоты, а в варианте *B.subtilis*+СК отмечено также максимальное накопление пролина. Известно, что салициловая кислота, участвует в регуляции метаболизма азота, пролина, синтеза глицин-бетаина, антиоксидантной системы защиты и водного потенциала в условиях стресса [15]. Полученные результаты свидетельствуют, что ответные реакции растений картофеля, инфицированного Y- вирусом картофеля и выращиваемого в условиях водного дефицита, скорее всего, достигнуты действием сигнальных молекул – салициловой кислоты и метилжасмоната, а биологическая эффективность штамма *B. subtilis* 47 оказалась невысокой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б20Р-154.

Литература

1. Statistic // FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Режим доступа: <https://www.statista.com/statistics/382174/global-potato-production>. – Дата доступа: 10.01.2021.
2. Пузанский Р. К. Метаболомика – современный подход при изучении адаптации растений картофеля к биотическому и абиотическому стрессу (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, № 1. С. 15-28.
3. Hamooh B. T., Sattar F. A., Wellman G., Mousa M. A. A. Metabolomic and biochemical analysis of two potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars exposed to in vitro osmotic and salt stresses // Plants. 2021. Vol. 10(1). P. 98.
4. Макарова С. С., Макаров В. В., Тальянский М. Э., Калинина Н. О. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. №1. С. 62-73.
5. Lastochkina O. B. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biotic Strategy to Cope with Abiotic Stresses in Wheat / O.B. Lastochkina [et al.] // Wheat Production in Changing Environments. 2019. P.579-614.
6. Коломиец Э. И., Сверчкова Н. В., Мандрик-Литвинкович М. Н. Экологически безопасные биотехнологии для сельского хозяйства // Наука и инновации. 2019. № 3 (193). С. 4–9.
7. Гриц А. Н. Действие комплексного препарата с индукторами устойчивости к патогенам на инфицирование X-вирусом растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) / А. Н. Гриц [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. 2021. Т. 66, № 2. С. 159–168.
8. Бурханова Г. Ф. Эндوفитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивостью картофеля к вирусам / Г.Ф. Бурханова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23, №7. С. 873-878
9. Сорокань А. В., Бурханова Г. Ф., Алексеев В. Ю., Максимов И. В. Влияние совместной обработки эндوفитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 109–130.
10. Максимов И. В. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе / И.В. Максимов [и др.] // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 2. С. 243–251.
11. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля / Рос. с.-х. акад. НПО по картофелеводству. – М.:Коренево, 2016. – 8с.
12. Bates L. S., Waldren R. P., Teare J. D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies// Plant and Soil.1973. – V. 39, № 1. – P. 205–207.
13. Ермаков А. И., Арасимович В.В., Яраш Н. П. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, Ленинград,1987. 400 с.

14. Луговая А. А. Влияние жасмоновой кислоты на продуктивность растений ячменя и их устойчивость к засухе и грибным инфекциям // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер. Біологія. 2015. Вип. 3 (36). С. 54-61.
15. Miura K., Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.*, 2014, 5: 4.

Responses of potato plants treated mixtures *Bacillus subtilis* and immunomodulators in water deficiency conditions and viral infection

J. N. Kalatskaja^{1*}, H. L. Nedved¹, N. V. Baliuk¹, K. M. Herasimovich¹, E. I. Rybinskaya¹, I. A. Ovchinnikov¹, N. A. Kopylova¹, L. G. Yarullina², N. A. Laman¹

¹*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus*

17 Akademicheskaya Street, 220072 Minsk, Republic of Belarus.

²*Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences*
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

*Email: kalatskayaj@mail.ru

Treatment with *Bacillus subtilis* 47 mixtures with MeJ or with MeJ+SA of potato plants infected with the Y-virus and grown under water deficiency conditions, promotes active plant growth in comparison with infected plants and reduces the viral load by 16% and 12%, respectively. At the same time, an increase in the proline content and the total peroxidase activity in the leaves of plants was revealed. The applied of *B. subtilis* alone or with SA did not cause a positive effect on reducing infection or preserving plant growth at water deficiency conditions.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., *Bacillus subtilis* 47, salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJ), Y potato virus, proline, peroxidase

Оценка влияния стевиозида на прорастание семян и рост проростков *Rhodiola rosea* в культуре *in vitro*

© А.С. Киселева, У.А. Галиханова*

Казанский государственный университет
Россия, Республика Татарстан, 420008 г. Казань, улица Кремлевская, 18.

*Email: uliana_ogo@mail.ru

Цель работы заключалась в оценке особенностей проростков родиолы розовой, обработанных стевиозидом, при введении их в культуру *in vitro*. Установили, что обработка стевиозидом (10^{-8} М, 3ч) сокращает время прорастания семян родиолы розовой, повышает всхожесть семян, стимулирует рост надземной и подземной части проростков. Показано, что полученные *in vitro* растения родиолы розовой из обработанных стевиозидом проростков формируют большее количество листьев и корней, чем контрольные растения.

Ключевые слова: родиола розовая, *Rhodiola rosea*, стевиозид.

Rhodiola rosea L. (родиола розовая) – редкое лекарственное растение, благодаря уникальному биохимическому составу обладает стимулирующими и адаптогенными свойствами, высокой антиоксидантной активностью.

В связи с тем, что лекарственным растительным сырьем являются корневища с корнями, в настоящее время из-за их неконтролируемого сбора произошло резкое сокращение численности и истощение природных популяций растения. Вид родиола розовая занесен в Красные книги отдельных регионов и Российской Федерации. Кроме того, существует целый ряд факторов, препятствующих восстановлению разреженных зарослей родиолы: медленный рост корневища (восстановление зарослей в течение 5-10 лет), очень низкая семенная всхожесть (до 30%), необходимость длительной стратификации, высокий процент гибели проростков первого года, сокращение численности женских особей в большинстве популяций [1,2].

Одним из решений данной проблемы является вегетативное размножение родиолы розовой, в том числе с использованием биотехнологических подходов, выращивая растения *in vitro* в лабораторных условиях. Культивирование *in vitro* позволяет не только сохранять природные популяции, но и является одним из альтернативных источников получения лекарственного сырья.

По литературным данным установлено, что применение стратификации и регуляторов роста повышает энергию прорастания и всхожесть семян, способствует уменьшению числа погибших проростков у родиолы розовой [3]. Исследования [4,5] свидетельствуют о том, что энт-каурановый гликозид – стевиозид растения *Stevia rebaudiana* может быть использован в качестве регулятора роста и развития растений, повышая активность альфа-амилазы и усиливая процессы роста надземной и подземной части проростков озимой и яровой пшеницы, семена которой перед посадкой были обработаны раствором стевиозида (10^{-8} М, 24 ч).

В связи с этим цель работы заключалась в оценке особенностей проростков родиолы розовой, обработанных стевиозидом, при введении их в культуру *in vitro*.

Объектом исследования служили проростки родиолы розовой, выращенные из семян (сбор 2019 г.), приобретенных в питомнике Анисимова Г. П. (г. Томск).

Эксплантами для введения в культуру *in vitro* служили проростки с корнями родиолы розовой, полученные из стратифицированных семян, с дополнительной обработкой раствором стевиозида.

Предпосевная обработка семян включала стратификацию в холодильной камере в течение 30 дней при температуре +4°C на фильтровальной бумаге. Семена перед посадкой замачивали на 24 ч. Для подбора наиболее эффективной схемы обработки родиолы стевиозидом часть семян обрабатывали исследуемым веществом в концентрации 10^{-8} М в течение разного времени: 3, 6, 12, 24 ч. Контрольные семена замачивали на 24 часа в водопроводной воде. Проростки выращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение двух месяцев в растительне (фотопериод 16/8-часовой цикл свет/темнота, интенсивность освещения 8 клк, температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Поверхностную стерилизацию проростков проводили с использованием различных концентраций раствора «Белизны», содержащей активный хлор (концентрация гипохлорита натрия в «Белизне» составляла 0.80%).

Промытые водой проростки родиолы розовой переносили в 70% раствор этанола на 30 секунд и затем в раствор «Белизны». Были проанализированы растворы с концентрацией гипохлорита натрия: 0.10%, 0.13%, 0.16%, 0.20%, 0.40%. Время экспозиции в соответствующих растворах – 20 минут. Затем экспланты трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на питательную среду.

Разработанные схемы стерилизации проростков родиолы розовой приведены в таблице 1.

Таблица 1. Схемы стерилизации проростков родиолы розовой

Номер схемы	Концентрация стерилизующего агента и время выдержки	
	Этиловый спирт	Гипохлорит натрия
1	70%, 30 секунд	0.10%, 20 минут
2		0.13%, 20 минут
3		0.16%, 20 минут
4		0.20%, 20 минут
5		0.40%, 20 минут

В качестве питательной среды для введения в культуру *in vitro* проростков родиолы розовой использовали среду Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 30 г/л сахарозы и 8 г/л агар-агара. Значение pH 5.8.

Полученные данные анализировали с использованием пакета компьютерных программ GraphPad Prism 5. Рассчитывали средние значения и стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение. По полученным данным можно сказать, что стевиозид действительно стимулировал прорастание семян родиолы розовой относительно контроля. На 3-й день наблюдений только в опытных вариантах с замачиванием в растворе стевиозида обнаружили проросшие семена. Во всех опытных вариантах проросло 30% семян кроме варианта с замачиванием на 24 ч (10%). Контрольные семена прорастали постепенно, начиная с 7-го дня наблюдений, к 60-му дню процент проросших семян составил 30%. Аналогичный результат через 2 месяца был зафиксирован в варианте с замачиванием семян в растворе стевиозида на 6 ч.

При 24 ч обработке процент прорастания был минимальный, а по достижении 7-дневного возраста проростки погибали. Более длительные экспозиции семян родиолы розовой в растворе стевиозида, по-видимому, оказывают ингибирующий эффект.

По нашим данным максимальный стимулирующий прорастание эффект оказывала обработка семян стевиозидом в течение 3-х и 12-и часов, значение показателя составило 40%. Однако данные варианты обработки семян стевиозидом не одинаково влияют на рост проростков. Несмотря на то, что оба варианта стимулируют рост надземной части проростков относительно контроля (рисунок 1А), увеличение длины подземной части зафиксировано только при кратковременной обработке в течение 3 часов (рисунок 1Б).

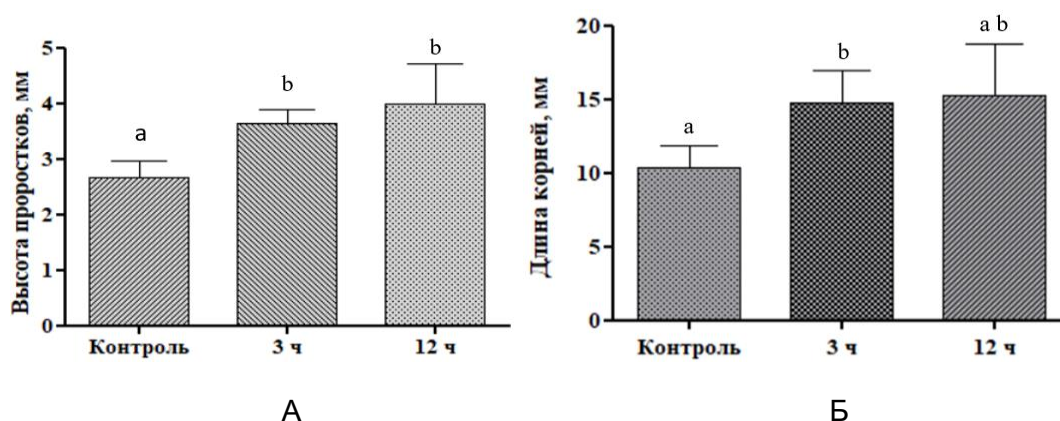


Рис. 1. Морфометрические показатели проростков родиолы розовой, обработанной перед посадкой стевиозидом (10^{-8} М): А - Длина надземной части на 30-й день выращивания, мм; Б – Длина подземной части на 30-й день выращивания, мм

По литературным данным подбор эффективного протокола стерилизации эксплантов родиолы розовой является одной из ключевых проблем при разработке биотехнологических подходов размножения растения или получения каллусных культур, и в каждом случае время и концентрацию необходимо подбирать экспериментально [1], [6]. Для подбора оптимального протокола стерилизации проростков родиолы розовой раствором «Белизны» в сочетании с выдержкой в этиловом спирте разработали четыре схемы, представленные в таблице 1. При использовании раствора «Белизны» в качестве стерилизующего агента целесообразно стремиться к снижению концентрации раствора, компенсируя это увеличением продолжительности стерилизации [7]. Результаты предварительных экспериментов свидетельствуют о том, что, по-видимому, обработка раствором «Белизны» с содержанием гипохлорита натрия 0.40% является губительной для проростков.

Таким образом, схема эксперимента по стерилизации проростков включала промывку проточной водой в течение 10 минут, выдержку в 70% этиловом спирте 30 секунд и в растворах «Белизны» с содержанием гипохлорита натрия 0.10%, 0.13%, 0.16% или

0.20% в течение 20 минут с последующей трехкратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой. Как видно из рисунка 2, наибольшую эффективность показала схема с использованием 0.16% раствора гипохлорита натрия, стерильность жизнеспособных эксплантов составила 81%.

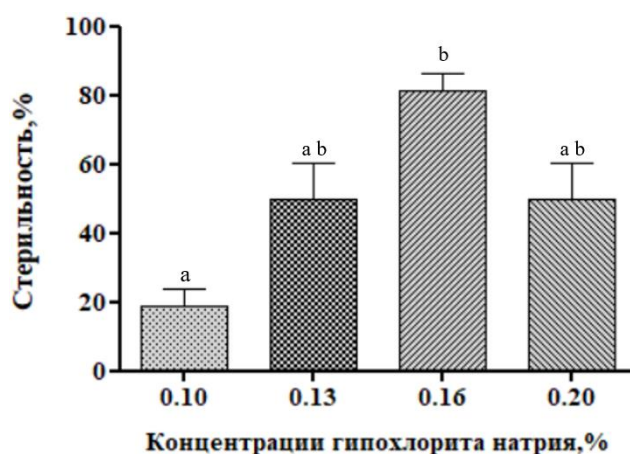


Рис. 2. Процент стерильности жизнеспособных проростков родиолы розовой в культуре *in vitro*.

Полученные проростки после стерилизации согласно схеме 3 (таблица 1) переносили на безгормональную питательную среду МС и выращивали в течение 3-х месяцев в растильне. Затем провели повторный морфологический анализ контрольных и опытных проростков родиолы розовой.

Результаты измерений морфологических параметров родиолы на 3-м месяце культивирования представлены в таблице 2.

Таблица 2. Морфологические параметры родиолы розовой в культуре *in vitro*, срок культивирования - 3 месяца

Морфологические параметры	Контроль (вода)	Опыт (3 ч стевиозид)
Высота побегов, см	2.93±2.32	2.65±1.33
Длина корней, см	2±0.71	2.13±0.48
Количество побегов, шт	1.5±0.71	2.5±1.29
Количество корней, шт	29±2.83	46.5±11.36 *
Количество листьев/растение, шт	10.5±2.12	23.5±5.80 *

Как видно из таблицы 2, длина надземной и подземной части контрольных и обработанных стевиозидом растений не отличается, однако исследуемый гликозид вызывает увеличение количества листьев и корней у проростков родиолы розовой в культуре *in vitro*. По-видимому, биомасса опытных растений оказывается выше контрольных, что может позволить значительно повысить коэффициент размножения *Rhodiola rosea* L. в культуре *in vitro*.

Таким образом, показано, что стевиозид в концентрации 10^{-8} М сокращает время прорастания семян родиолы розовой. Однако только 3-х часовая предпосевная обработка данным гликозидом повышает всхожесть семян, стимулирует рост надземной и под-

земной части проростков. Установлено, что наиболее эффективная схема для стерилизации проростков родиолы: сочетание 0.16% раствора гипохлорита натрия с предварительной обработкой 70% этиловым спиртом. Показано, что полученные *in vitro* растения родиолы розовой из обработанных стевиозидом проростков формируют большее количество листьев и корней, чем контрольные растения.

Литература

1. Tasheva K. Bulgarian golden root *in vitro* cultures for micropropagation and reintroduction // Open Life Sciences. 2010. V. 5(6). P. 853-863. DOI: 10.2478/s11535-010-0092-3
2. Павлова П. А. Интродукционное испытание *Rhodiola rosea* L. в якутском ботаническом саду // Вестник КрасГАУ. 2015. №4. С. 94-98.
3. Андросова Д. Н. Эколого-биологические особенности прорастания семян травянистых растений природной флоры Центральной Якутии при интродукции : автореф. дис. на соиск. уч. ст., канд. биол. наук / Д. Н. Андросова, 2021. – 181 с.
4. Савченко О. М. Влияние стратификации и регуляторов роста на энергию прорастания и всхожесть трех видов рода родиола (*Rhodiola* L.) // Биология растений и садоводство: теория, инновации. 2018. С. 112-116. DOI: 10.25684/NBG.scbook.146.2018.16
5. Ogorodnova U. A. The chemical structure of steviol-glycosides as base of biological activity // International Journal of Pharmacy & Technology. 2016. V .8. P. 14936-14944.
6. Galikhanova U. A. Stevioside-induced molecular heterogeneity and lectin activity at low positive temperatures // Caspian J. Environ. Sci. 2020. Vol. 18. №5. P. 473-480. DOI: 10.22124 / CJES.2020.4473
7. Erst A. In vitro propagation of rare species *Rhodiola rosea* from Altai Mountains // Turczaninowia. 2018. Vol. 21. С. 78-86. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.4.9
8. Лебедь М. Б. Исследование эффективности различных способов стерилизации эксплантов картофеля при микроклональном размножении // Успехи современного естествознания. 2019. № 9. С. 26-30.

Полиморфные варианты гена *NOX1* и риск развития сахарного диабета второго типа

© Е. Ю. Клёсова*, Ю. Э. Азарова, А. В. Полоников

*Курский государственный медицинский университет
Россия, 305041 г. Курск, улица Карла Маркса, 3.*

**Email: ecless@yandex.ru*

Установлена ассоциация локуса *rs5921678* гена *NOX1* с риском развития сахарного диабета 2 типа у женщин в русской популяции.

Ключевые слова: *NOX1*, однонуклеотидный полиморфизм, NADPH-оксидаза, индекс массы тела, глюкоза крови, сахарный диабет 2 типа.

NOX1 – член семейства ферментов NADPH-оксидазы, главной функцией которых является генерация супероксид-аниона. NADPH-оксидаза 1 (рисунок 1) представляет собой пиридиннуклеотид-зависимую оксидоредуктазу, участвующую в регуляции клеточного pH [1].



Рис. 1. Трёхмерная структура фермента NADPH-оксидазы 1.

Активность NADPH-оксидазы 1 в значительной степени определяет баланс в редокс-системе. Именно нарушения в этой системе являются причиной развития окислительного стресса и составляют основу патогенеза сахарного диабета 2 типа (СД2), одного из самых распространенных метаболических заболеваний в мире [2].

Целью настоящей работы стало изучение ассоциаций полиморфных однонуклеотидных вариантов *rs5921678*, *rs5921668*, *rs5921682* гена *NOX1* с биохимическими показателями плазмы крови, а также с риском у больных СД2 женщин и здоровых лиц.

В исследование принимали участие 2012 женщин, из них 988 человек (средний возраст 62,2±6,7 лет) составили группу больных СД2, получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи с декабря 2016 по октябрь 2019 гг, и 1024 вошли в группу контроля - доноры областной станции переливания крови. У всех участников исследования проводили однократный забор 10 мл крови натощак в вакуумные пробирки с ЭДТА (для генетического тестирования) и гепарином лития (для биохимического анализа). Геномную ДНК выделяли колоночным методом с помощью набора QIAamp DNA blood kit (QIAGEN) на автоматической станции QiaCube (QIAGEN, Германия). Генотипирование полиморфизмов гена *NOX1* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4 (Agena Bioscience, США). Концентрации перекиси водорода и глутатиона в плазме крови определяли с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay kit (Cell Biolabs), GSH/GSSG Assay kit (Abcam) флуориметрическим методом на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, С-пептида, общего холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛВП, ЛНП) и триацилглицеролов (ТАГ) определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) стандартными наборами реагентов фирмы «Диакон-ДС» (Россия). Ассоциации генотипов с риском СД2 изучали методом логистической регрессии с поправкой на пол, возраст и ИМТ с помощью программы SNPStats [3].

С помощью онлайн-программы GTEch Portal [4], мы провели анализ тканеспецифичных эффектов минорных аллелей изучаемых SNPs и обнаружили, что носители генотипа T/T rs5921678, T/T rs5921668 и G/G rs5921682 имеют более низкую экспрессию *NOX1* в широком спектре тканей.

Генотип T/T rs5921678 ассоциировался с пониженным риском СД2 у женщин (OR 0,73, 95% CI 0.57-0.93, P=0.012, рецессивная модель). Ассоциация осталась значимой и после введения поправок на возраст и ИМТ (OR 0,75, 95% CI 0.58-0.97, P_{adj}=0.028). Частоты аллелей и генотипов rs5921668 и rs5921682 между группами больных СД2 и контроля статистически значимо не отличались (p>0.05).

Анализ неравновесия по сцеплению показал, что rs5921678 сцеплен с rs5921668 (D'=0,9212, P<0,0001, Таблица 1).

Таблица 1. Неравновесие по сцеплению между полиморфными вариантами гена *NOX1*.

SNP ID	rs5921668	rs5921678	rs5921682
rs5921668		0.1841	-0.0673
		0.9212	0.4327
rs5921678			-0.0856
			0.4705

Показатели неравновесия по сцеплению между SNPs: верхние ячейки – D (заливка серым), нижние – D'. Представлены только статистически значимые показатели неравновесия по сцеплению (P<1.0*10⁻⁹).

Анализ частот гаплотипов установил, что гаплотип rs5921668-A- rs5921678-T- rs5921682-A оказывает протективный эффект на риск развития заболевания (OR 0,68, 95% CI 0.50-0.91, p_{adj}=0.011, Таблица 2).

Таблица 2. Распределение и анализ ассоциаций гаплотипов *NOX1* с риском развития СД2.

SNPs H	rs5921668	rs5921678	rs5921682	Контроль	Больные СД2	OR (95%CI) ¹	P
H1	A	C	G	0.3735	0.3943	1.00	---
H2	A	C	A	0.2207	0.2351	1.00 (0.84 - 1.18)	0.96
H3	G	T	A	0.233	0.2135	0.87 (0.74 - 1.03)	0.1
H4	G	T	G	0.0761	0.0828	1.02 (0.78 - 1.34)	0.87
H5	A	T	A	0.0626	0.0425	0.68 (0.50 - 0.91)	0.011
H6	A	T	G	0.0135	0.0209	1.37 (0.79 - 2.36)	0.26
редкие	*	*	*	0.0091	0.007	0.53 (0.31 - 0.89)	0.017
Общий P ассоциаций: 0.015							

Анализ связи изучаемых SNPs с биохимическими показателями выявил, что уровень гликированного гемоглобина у носителей генотипа T/T rs5921678 на 3,96 ммоль/л выше, чем у носителей референсного аллеля C (P=0,01).

Таким образом, в проведенном исследовании впервые в русской популяции установлена ассоциация rs5921678 гена *NOX1* с пониженным риском развития СД2. Протективный эффект данного варианта в отношении заболевания объясняется менее выраженным синтезом супероксид-продуцирующего фермента НАДФН-оксидазы у носителей минорного аллеля T, что проявляется снижением окислительного стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-15-00227).

Литература

1. Wendt, Maria C., et al. "Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4." *Free Radical Biology and Medicine* 39.3 (2005): 381-391. Edghill E.L., Bingham C., Ellard S., Hattersley A.T. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J Med Genet* 2006; 43: 84-90. doi.org/10.1136/jmg.2005.032854.
2. World Health Organization et al. Global status report on noncommunicable diseases 2014. – World Health Organization, 2014. – №. WHO/NMH/NVI/15.1.
3. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22(15): 1928-1929. doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268.
4. GTEx Consortium. "The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multi-tissue gene regulation in humans." *Science* 348.6235 (2015): 648-660.

Polymorphic variants at *NOX1* gene and the risk of type 2 diabetes mellitus

E. Klyosova*, I. Azarova, A. Polonikov

*Kursk State Medical University
3 Karl Marx Street, 305041 Kursk, Russia.*

**Email: ecless@yandex.ru*

An association of the rs5921678 at the *NOX1* gene with a risk of developing type 2 diabetes in the Russian population in females has been established.

Keywords: *NOX1*, single nucleotide polymorphism, NADPH oxidase, body mass index, blood glucose, type 2 diabetes mellitus

Роль гена NPY в развитии ожирения и нарушения пищевого поведения у детей

© О.В. Кочетова^{1,2}, З.А. Шангареева², Т.Т. Ахметкиреева¹, Г.Ф. Корытина¹

¹*Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Уфа, 450054, Россия*

²*Башкирский государственный медицинский университет
Уфа, 450008, Россия*

E-mail: Olga_mk78@mail.ru

Для оценки роли полиморфных вариантов локуса rs16147 гена NPY в развитии ожирения и пищевого поведения проведен анализ распределения генотипов в группах детей с ожирением и в контроле, а также анализ количественных параметров пищевого поведения и ожирения. Статистически значимые различия были получены при анализе баллов опросника CEBQ в группе здоровых детей. Статистически значимые различия были получены для шкал FR (ответная реакция на пищу) и SR (ощущение сытости) $p=0.015$ и $p=0.027$.

Ключевые слова: ожирение, полиморфизм, Нейропептид Y, CEБQ, пищевое поведение.

По данным ВОЗ, количество случаев детского ожирения во всем мире достигло тревожного уровня (<https://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/ru/>). В России также отмечают рост числа детей с ожирением [1]. Известно, что ожирение – это дисбаланс между расходом и потреблением энергии. Однако ряд научных исследований связывают риск развития ожирения как с питанием матери в период беременности, непродолжительностью грудного вскармливания, а также генетической предрасположенностью. Известно более 79 синдромов, связанных с ожирением. Выявление генов морбидного ожирения позволит проводить корректирующую терапию начиная с детства [2].

Материал и методы. В исследовании были использованы образцы ДНК 330 детей с ожирением и 416 детей с нормальной массой тела. Средний возраст детей в группе с ожирением составил 7.1 ± 2.3 лет, в контрольной группе 7.3 ± 2.5 лет (возраст варьировал от 2 до 10 лет). Антропометрическое измерение было осуществлено в соответствии со стандартными методами. Для оценки антропометрического статуса использовались справочные таблицы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2006 и 2007 годы, которые основаны на Z-баллах для индекса массы тела (ИМТ) в зависимости от пола и возраста. Для статистического анализа избыточный вес был определен следующим образом: для детей до 5 лет ($z > +2$ балла) (<http://who.int/childgrowth/standards/ru/>), для детей в возрасте от 5 до 10 лет ($z > +1$) (http://who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/index.html). Выборка сформирована на базе многопрофильного стационара (ГКБ №17 г. Уфа).

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием метода фенольно-хлороформной очистки. Условия проведения ПЦР, последовательности праймеров представлены в работе Laddha NC, с соавт., 2014 [3]. Результаты амплификации и рестрикции оценивали при помощи вертикального электрофореза в 6–8%-ном полиакриламидном геле. Гель окрашивали раствором бромистого этидия (0.1 мкг/мл) в течение 15 мин и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения размеров продукта использовали маркер молекулярной массы с шагом 100 пн (СибЭнзим, Россия). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП "Биомика" и УНУ "КОДИНК" (ИБГ УФИЦ РАН).

Анализ пищевого поведения (ПП) проводили по опроснику Child Eating Behaviour Questionnaire (CEBQ) [8]. Опросник состоит из 8 шкал, таких как: реагирование на еду (Food responsiveness, FR); удовольствие от еды (Enjoyment of food, EF); ощущение сытости (Satiety responsiveness, SR); медлительность в приеме пищи (Slowness in eating, SE); суетливость, привередливость в еде (Food fussiness, FF); эмоциональное переедание (Emotional over-eating, EOE); эмоциональное недоедание (Emotional under-eating, EUE); желание частого употребления напитков (Desire to drink, DD), измеряемых в баллах. CEBQ обладает хорошими психометрическими свойствами: внутренней согласованностью, надежностью тестирования и стабильностью в динамике. Используется для анализа пищевого поведения детей младшего возраста.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили, используя пакеты прикладных программ SPSS Statistics 22. Логистическую регрессию использовали для выявления ассоциации полиморфных вариантов изученных генов с развитием ожирения и пищевого поведения; экспоненту отдельного коэффициента регрессии (*beta*) интерпретировали как отношение шансов (OR) с расчетом 95%-ного доверительного интервала. Вклад аллельных вариантов изучаемых генов-кандидатов в вариабельность количественных клинико-биохимических показателей (уровень глюкозы) и баллов CEBQ определяли с помощью критерия Крускала–Уоллиса (в случае трех групп) или Манна–Уитни (в случае двух групп).

Результаты. Был проведен анализ на соответствие распределения частот генотипов полиморфного локуса rs16147 гена *NPY* равновесию Харди–Вайнберга в выборках больных и в контроле. Получены следующие результаты при изучении группы контроля ($PX-B=0.27$), в группе больных ($PX-B=0.09$).

Анализ распределения генотипов не выявил статистически значимых различий при сравнении групп пациентов и контроля ни в одной из моделей (табл. 1).

Таблица 1. Анализ полиморфного локуса rs16147 гена *NPY* с развитием ожирения у детей

SNP-ID	Модель	Генотип	Дети с ожирением N (%)	Контроль N (%)	Без поправки		С учетом поправки	
					OR (95% CI)	p^a	OR (95% CI)	p^b
rs16147	Кодоминантная		109 (33)		1.00		1.00	0.15
		CC	148 (44.9)	123 (29.5)	0.77 (0.55- 1.07)	0.14	0.77 (0.55- 1.08)	
		CT	73 (22.1)	217 (52.0)	1.07 (0.71- 1.61)		1.08 (0.71- 1.62)	
	TT		77 (18.5)					
Доминантная	CC	109 (33.0)	123 (29.5)	1.00		1.00	0.32	
	CT - TT	221 (67.0)	294 (70.5)	0.85 (0.62- 1.16)	0.3	0.85 (0.62- 1.16)		
Рецессивная	CC - CT	257 (77.9)	340 (81.5)	1.00		1.00	0.21	
	TT	73 (22.1)	77 (18.5)	1.25 (0.88- 1.80)	0.22	1.26 (0.88- 1.80)		
Аддитивная	---	---	---	---	1.00 (0.82- 1.23)	0.98	1.01 (0.82- 1.23)	0.96

Примечание: SNP: Single nucleotide polymorphism; OR: Отношение шансов; 95% CI: 95% доверительный интервал.

p^a - значение, рассчитанное по критерию хи-квадрат

p^b - значение, рассчитанное по критерию хи-квадрат с учетом гендерной принадлежности

* $p < 0.05$ уровень статистической значимости.

Далее мы провели анализ количественных параметров пищевого поведения оцененного по опроснику SEBQ и индексу массы тела в группах детей с ожирением и нормальной массой тела. Данные представлены в таблице 2. Статистически значимых различий при анализе детей с ожирением получено не было. В группе детей с нормальной массой тела статистически значимые ассоциации были выявлены по шкале FR (ответная реакция на пищу) и SR (ощущение сытости) $p=0.015$ и $p=0.027$, соответственно. Шкала FR отражает общий аппетит и употребление пищи ребенком при отсутствии голода. Установлено, что у детей с нормальной массой ответная реакция на пищевые

стимулы усиливается при нарастании чувства голода, тогда как у детей с ожирением реакция на внешние пищевые стимулы, чувство сытости у ребенка снижаются с увеличением массы тел [4].

Таблица 2. Анализ полиморфных вариантов гена *NPY* в вариабельность показателей, характеризующих ожирение и пищевое поведение у детей

SNP	Ответная реакция на пищу (FR)	Эмоциональной переедание (EOE)	Удовольствие от еды (EF)	Желание пить (DD)	Ощущение сытости (SR)	Медлительность в еде (SE)	Эмоциональное недоедание (EUE)	Суетливость в питании (FF)	ИМТ Beta (CI 95%)
Дети с ожирением									
NPY rs16147	-0.15 (-0.38 - 0.08), 0.21	-0.04 (-0.25 - 0.16), 0.7	-0.11 (-0.38 - 0.15), 0.39	-0.04 (-0.35 - 0.26), 0.78	-0.16 (-0.35 - 0.03), 0.11	-0.11 (-0.35 - 0.12), 0.35	0.03 (-0.24 - 0.31), 0.82	0.01 (-0.15 - 0.18), 0.9	0.54 (-1.71 - 2.79), 0.64
Дети с нормальной массой тела									
NPY rs16147	-0.45 (-0.79 - 0.11), 0.015	-0.20 (-0.47 - 0.08), 0.18	-0.10 (-0.47 - 0.26), 0.58	-0.75 (-1.19 - 0.31), 0.002	-0.37 (-0.67 - 0.06), 0.027	-0.17 (-0.50 - 0.17), 0.33	0.06 (-0.40 - 0.53), 0.79	0.01 (-0.27 - 0.30), 0.92	0.03 (-0.72 - 0.77), 0.94

Согласно базе <https://regulomedb.org/regulome-help/> полиморфный локус rs16147 гена *NPY* расположен в промоторной области, относится к сайтам связывания с факторами транскрипции. По экспериментальным данным установлено, что этот полиморфизм и способен изменять экспрессию гена *in vitro*. **Однако несмотря на предполагаемое важное значение локуса rs16147 гена *NPY* в механизме регуляции пищевого поведения и ожирения, достоверных и значимых различий по данным литературы выявлено немного, а получаемые различия противоречивы. Установлено, что у носителей аллеля Т наблюдается увеличение уровней экспрессии *NPY* [5]. По нашим данным носители аллеля Т имеют сниженные уровни параметра реагирования на еду и повышенный уровень параметра ощущения сытости.**

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект №20-013-00261).

Литература

1. Намазова-Баранова Л. С., Елецкая К. А., Кайтукова Е. В., Макарова С. Г. (2018). Оценка физического развития детей среднего и старшего школьного возраста: анализ результатов одномоментного исследования. Педиатрическая фармакология, 15(4).
2. Kaur, Y., Wang, D. X., Liu, H. Y., Meyre, D. (2019). Comprehensive identification of pleiotropic loci for body fat distribution using the NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies. Obesity Reviews, 20(3), 385-406.

3. Laddha NC, Dwivedi M, Mansuri MS, Singh M, Patel HH, Agarwal N, et al. (2014) Association of Neuropeptide Y (*NPY*), Interleukin-1B (*IL1B*) Genetic Variants and Correlation of *IL1B* Transcript Levels with Vitiligo Susceptibility. PLoS ONE 9(9): e107020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107020>
4. Гирш Я.В., Юдицкая Т.А. Сравнительный анализ пищевого поведения детей различных возрастных групп. Бюллетень сибирской медицины. 2018; 17 (2): 21–30
5. Olza J., Gil-Campos M., Leis R., Rupérez A. I., Tojo R., Cañete R., Aguilera C. M. (2013). Influence of variants in the *NPY* gene on obesity and metabolic syndrome features in Spanish children. *Peptides*, 45, 22-27.

The role of the *NPY* gene in the development of obesity and eating disorders in children

Kochetova O.V.^{1,2}, Shangareeva Z A², Akhmetkireeva T.T,¹ Korytina G F¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

² *Bashkir State Medical University, 47 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

E-mail: Olga_mk78@mail.ru

To assess the role of polymorphic variants of the rs16147 locus of the *NPY* gene in the development of obesity and eating behavior, we analyzed the distribution of genotypes in groups of obese children and in the control group, as well as analyzed the quantitative parameters of eating behavior and obesity. Statistically significant differences were obtained when analyzing the scores of the CEBQ questionnaire in the group of healthy children. Statistically significant differences were obtained for the FR (response to food) and SR (feeling of satiety) scales $p = 0.015$ and $p = 0.027$.

Keywords: obesity, polymorphism, Neuropeptide Y, CEBQ, eating behavior

Индукция засухоустойчивости растений *Triticum aestivum* L. (пшеницы) разных агроэкологических групп эндофитными бактериями *Bacillus subtilis*

© О. В. Ласточкина^{1*}, Д. Р. Масленникова¹, Д. Ю. Гаршина²

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450059 г. Уфа, улица Рихарда Зорге, 19.

*Email: oksanaibg@gmail.com

Установлено, что важный вклад в вызываемую эндофитными бактериями *B. subtilis* 10-4 адаптацию и засухоустойчивость растений пшеницы – представителей степного Волжского (сорт Экада70) и лесостепного западносибирского (сорт Салават Юлаев) экотипов вносит способность этих бактерий регулировать состояние компонентов AsA-GSH комплекса и стабилизировать окислительный статус в клетках растений при стрессе.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., экотипы, засуха, бактерии-эндофиты, *Bacillus subtilis*, растительно-микробные взаимодействия, H₂O₂, МДА, AsA-GSH комплекс, индуцированная устойчивость.

Triticum aestivum L. (мягкая яровая пшеница) - наиболее распространенная в мире ценная зерновая продовольственная культура [1]. Доминирующим абиотическим стрессом, приводящим к снижению роста и продуктивности пшеницы, является засуха [2]. Применение стимулирующих рост растений эндофитных бактерий (PGPEB – Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria) *Bacillus subtilis*, способных активировать естественные защитные механизмы растений-хозяев, не вызывая негативного воздействия на них, окружающую среду и здоровье человека рассматривается как доступная, дешевая и экологически чистая биологическая стратегия улучшения адаптивного потенциала и урожайности растений в стрессовых условиях среды [2-4]. Одной из основных причин, сдерживающих в настоящее время разработку препаратов на основе бактерий-эндофитов является недостаток знаний о фундаментальных механизмах взаимодействия эндофитных *B. subtilis* с растениями в условиях дефицита влаги. Кроме того, возникают вопросы, связанные с тем, что эффективность одного и того же штамма *B. subtilis* может варьироваться в зависимости от многих факторов, включая спектр синтезируемых штаммами соединений, вид растений, их эколого-географическое происхождение, сортовые особенности, виды стрессов, которым подвергаются растения в период вегетации и мн. др. [2,4]. Ранее нами было выявлено, что сорта пшеницы, различающиеся по стратегии адаптации к засухе и принадлежащие к разным агроэкологическим группам (экотипам) (а именно, лесостепному западносибирскому и степному Волжскому), демонстрируют разную реакцию на инокуляцию одним и тем же эндофитным штаммом *B. subtilis* 10-4 при одном и том же стрессе (засуха) на ранних этапах онтогенеза [4]. Так, показано, что предпосевная обработка *B. subtilis* 10-4 [4] оказывает более заметный протекторный эффект на растения пшеницы степного Волжского экотипа в условиях засухи, как на уровне клеток, так и целого организма, тогда как для растений лесостепного западносибирского экотипа такого же защитного эффекта на

рост не наблюдалось, а на уровне клеток защита была на более низком уровне. Также было выявлено, что такой характер влияния *B. subtilis* 10-4 на рост растений пшеницы коррелирует с накоплением эндогенной салициловой кислоты (СК) в них и запуском СК-зависимых сигнальных путей.

В настоящей работе с использованием классических и современных физиолого-биохимических методов исследовано влияние предпосевной инокуляции эндофитными *B. subtilis* (штамм 10-4, рег. номер в ВКПМ В-12988) на содержание пероксида водорода (H_2O_2) [5], уровень перекисного окисления липидов (МДА) [6], а также состояние компонентов аскорбат-глутатионового (AsA-GSH) комплекса (аскорбат (AsA), восстановленный глутатион (GSH), окисленный глутатион (GSSG), аскорбат пероксидаза (APX), глутатион редуктаза (GR)) [7] в проростках яровой мягкой пшеницы – представителях степного Волжского (сорт Экада70, засухоустойчивый) и лесостепного западно-сибирского (сорт Салават Юлаев, засуховосприимчивый) экотипов в нормальных условиях произрастания и при засухе (12% ПЭГ-6000). Семена перед посевом стерилизовались 96% этанолом, замачивались в течение 1 часа в растворах *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) или воде [4]. Обработанные семена проращивались на фильтровальной бумаге, смоченной дист. водой в течение трех-четырех суток (16-часовой световой фотопериод, 15 клк, 22–24°C), пересаживались в растворы с 12% ПЭГ-6000 или воду и через разные промежутки времени проростки использовались для анализов. В рисунках приведены значения трех повторений \pm SEM. Разные буквы указывают на значительную разницу между средними на уровне вероятности $p < 0.05$.

Результаты показали, что воздействие засухи приводило к накоплению H_2O_2 (130-140% от контроля) в корнях 4-сут проростков сорта Экада70 (Рис. 1А) с пиком на 1 час воздействия стресса и вызывало транзитное почти трехкратное накопление (регистрируемое на 30 минутах эксперимента) в корнях проростков сорта Салават Юлаев (Рис. 1Б), что коррелировало с накоплением МДА в растениях обоих сортов (Рис. 1В). Предобработка *B. subtilis* 10-4 способствовала стабилизации состояния целостности мембранных структур при стрессе (Рис. 1).

Анализ важнейших неферментативных восстановителей клеток AsA и GSH, играющих ключевую роль в реализации физиологических процессов растительной клетки, а также в регуляции редокс-метаболизма, показал, что растения сортов Экада70 и Салават Юлаев различаются по уровню их содержания. Так, в нормальных условиях произрастания проростки пшеницы сорта Экада70 характеризовались незначительным, но достоверно большим (124 %) содержанием GSH (Рис. 2А) по сравнению с проростками сорта Салават Юлаев (Рис. 2Б), которые, при этом, содержали значительно больше AsA (160 %), что очевидно обусловлено их сортовыми особенностями. Предобработка *B. subtilis* 10-4 приводила к дополнительному накоплению AsA в растениях обоих сортов, при этом наибольшее накопление на протяжении всего опыта наблюдалось у сорта Экада70 (примерно 150 % от контроля). Уровень GSH у растений предобработанных *B. subtilis* 10-4 существенно не изменялся, хотя и наблюдалось небольшое его накопление. Важно отметить, что уровень GSSG в растениях обоих сортов, инокулированных *B. subtilis* 10-4, оставался неизменным, что свидетельствует об отсутствии негативного действия бактериальной обработки на физиологическое состояние растений.

Обнаружено, что растения сорта Салават Юлаев были более восприимчивы к воздействию засухи, о чем свидетельствует резкое падение содержания AsA более чем в 3 раза на протяжении всего опыта и практически двухкратное снижение уровня GSH, которое коррелирует с таким же по уровню накоплением GSSG (Рис. 2Б). Оценка содержания AsA и GSH в условиях засухи у пшеницы Экада70 демонстрирует заявленную засухоустойчивость данного сорта - падение содержания AsA составляет около 20 % относительно уровня контроля, при этом глутатионовая система реагирует на стресс ярче, о чем свидетельствует в среднем полуторакратное падение содержания GSH на

протяжении всего времени действия стресса и двукратное накопление GSSG к 1 часу воздействия стресса и заметное снижение его уровня к 5 часам воздействия стресса (Рис. 2А), что может говорить о том, что этот сорт может значительно легче адаптироваться к воздействию засухи. Это указывает на то, что одну из ключевых ролей в реализации засухоустойчивости у растений сортов Салават Юлаев и Экада70 играют AsA и GSH, соответственно.

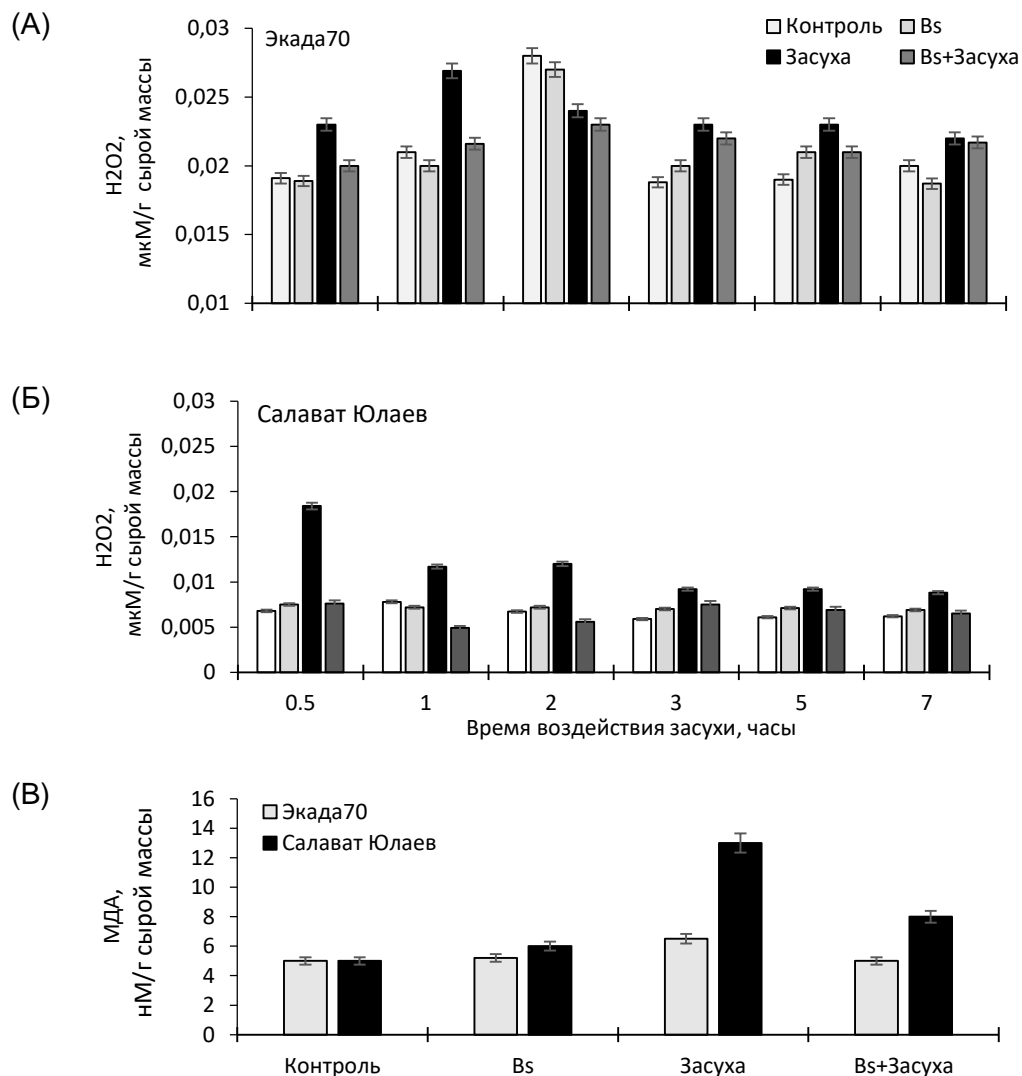


Рис. 1. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 (Bs) на содержание пероксида водорода (H₂O₂) (А, Б) и уровень перекисного окисления липидов (МДА) (В) в проростках яровой пшеницы сортов Экада 70 (степной Волжский экотип, засухоустойчивый) и Салават Юлаев (лесостепной западносибирский экотип, засуховосприимчивый) в норме и при засухе.

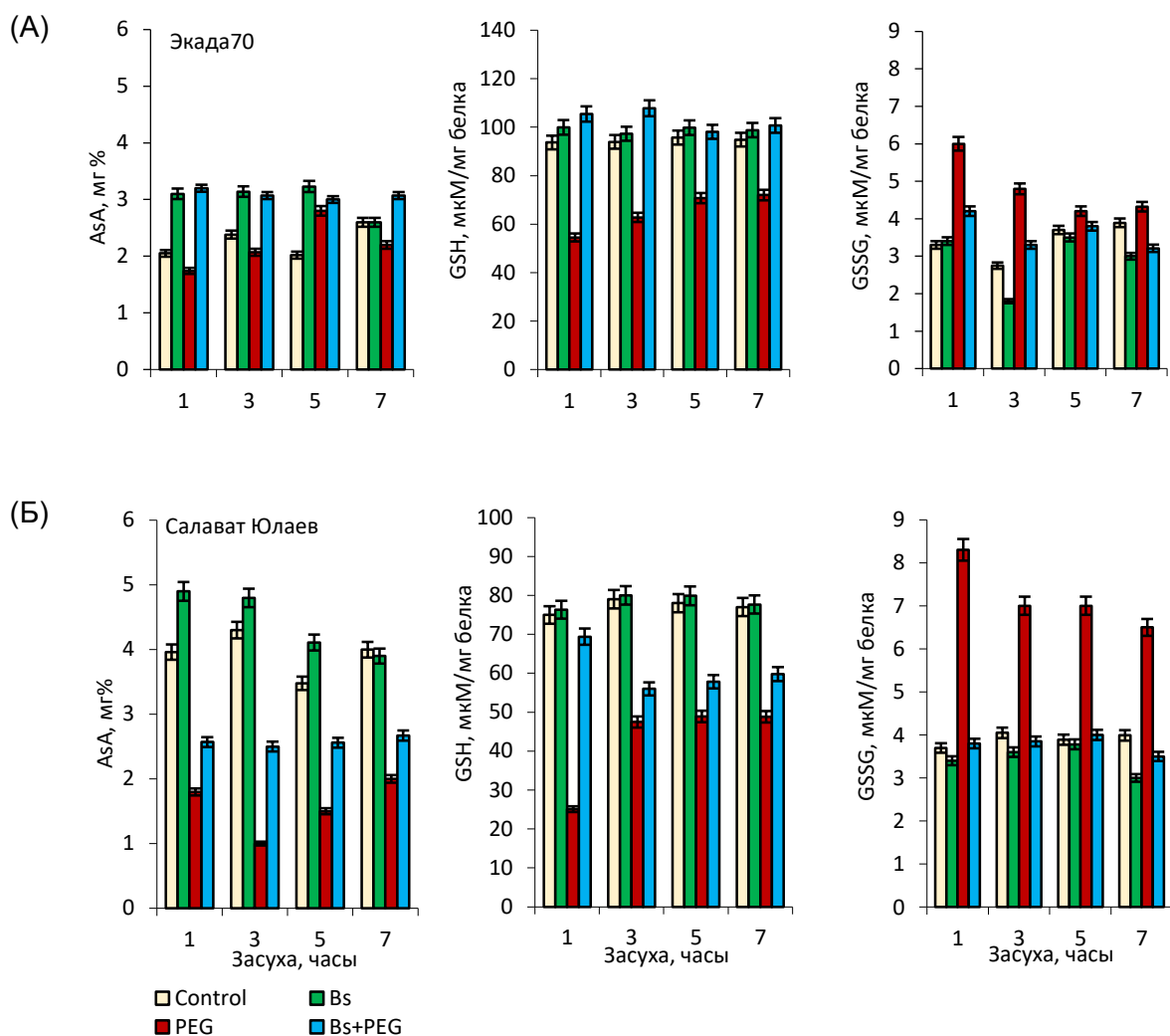


Рис. 2. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 (Bs) на содержание некоторых неферментативных антиоксидантов (аскорбата - AsA, восстановленного глутатиона - GSH, окисленного глутатиона - GSSG) в проростках яровой пшеницы сортов Экада 70 (степной Волжский экотип, засухоустойчивый сорт) (А) и Салават Юлаев (лесостепной западносибирский экотип, засуховосприимчивый сорт) (Б) в норме (Control) и при засухе (PEG).

Предобработка *B. subtilis* 10-4 не предотвращала стресс-индуцированное падение AsA в растениях сорта Салават Юлаев (Рис. 2Б), но способствовала поддержанию повышенного его уровня (130-250%) в сравнении с контрольными (небактеризованными) и стрессированными растениями. При этом наблюдалась стабилизация глутатионового статуса, содержание GSH на 1 часе воздействия стресса было достоверно выше контрольного, далее его уровень был выше стрессового, но не дотягивал до контрольного. При анализе антиоксидантов в растениях сорта Экада70 было обнаружено, что предобработка *B. subtilis* 10-4 приводит к дополнительному (до 150%) накоплению AsA в них. При этом наблюдалось полное восстановление до контрольных значений стресс-индуцированного дисбаланса GSH. В растениях обоих сортов предобработка *B. subtilis* 10-4 стабилизировала содержание GSSG до уровня контроля в условиях засухи (Рис. 2А,Б), что говорит об эффективности бактериальной обработки и демонстрирует выраженный защитный эффект.

Ключевую роль в стабильной работе AsA-GSH цикла, а также в стабилизации стресс-индуцированного дисбаланса составляющих про-/антиоксидантной систем отводят

ферментам APX и GR. В ходе работы было обнаружено, что засуха приводила к сильнейшей активации этих ферментов, при этом у растений сорта Салават Юлаев амплитуда ответа была выше, чем у растений сорта Экада70 (Рис. 3А,Б), такая работа ферментов находила свое отражение также в ходе оценки содержания H_2O_2 , МДА (Рис. 1), AsA и GSH (Рис. 2). Предобработка *B. subtilis* 10-4 в условиях стресса приводила к снижению активности APX и GR в растениях сорта Салават Юлаев. Тогда как у растений сорта Экада70 наблюдалось меньшее снижение (на 115-120% от контрольного) активности APX и дополнительная активация GR (на 125-130%).

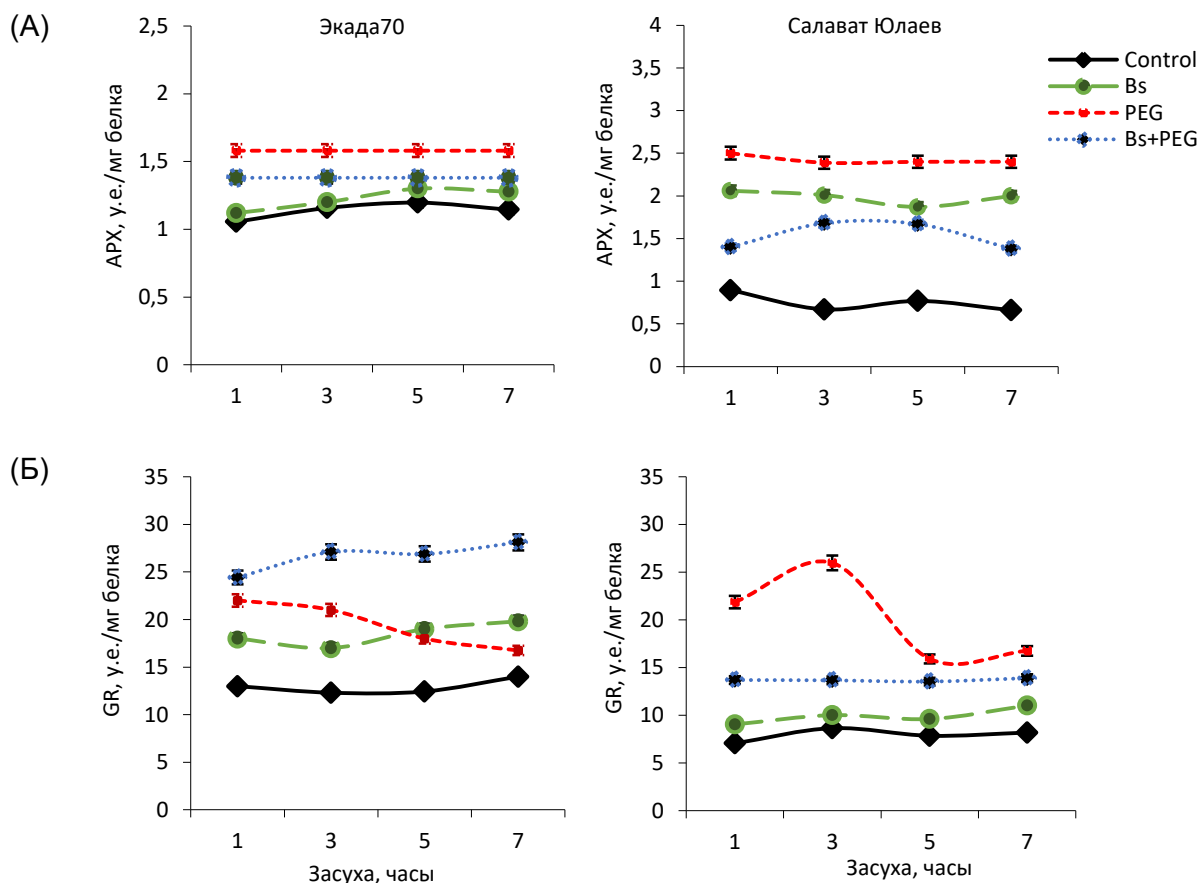


Рис. 3. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 (Bs) на активность аскорбатпероксидазы (APX) (А) и глутатион-редуктазы (GR) (Б) в проростках яровой пшеницы сортов Экада 70 (степной Волжский экотип, засухоустойчивый сорт) и Салават Юлаев (лесостепной западносибирский экотип, засуховосприимчивый сорт) в норме (Control) и при засухе (PEG).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 с целью повышения засухоустойчивости растений мягкой яровой пшеницы разных экотипов с наиболее выраженным защитным эффектом на растениях сорта Экада70 (степной Волжский экотип), что связано со способностью этих бактерий поддерживать целостность мембранных структур, а также регулировать состояние компонентов AsA-GSH комплекса и активность связанных с ними ферментов.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (номер проекта 19-016-00035) и частично в рамках гос. задания (номер гос. регистрации АААА-А21-121011990120-7) с использованием оборудования ЦКП «Агидель» и УНУ «Кодинк» УФИЦ РАН.

Литература

1. FAO (2016) Available online: <http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf> (2016)
2. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Kalhor M.S., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth promoting bacteria - biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat. In: Wheat production in changing environments: Management, adaptation and tolerance / M. Hasanuzzaman, K. Nahar, A. Hossain (eds.). Singapore. Springer. 2019. P. 579–614.
3. Sood G., Kaushal R., Sharma M. Significance of Inoculation with *Bacillus subtilis* to Alleviate Drought Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Vegetos*, 2020. V. 33. P. 782–792.
4. Lastochkina O., Garshina D., Ivanov S., Yuldashev R., Khafizova R., Allagulova Ch., Fedorova K., Avalbaev A., Maslennikova D., Bosacchi M. Seed Priming with Endophytic *Bacillus subtilis* Modulates Physiological Responses of Two Different *Triticum aestivum* L. Cultivars Under Drought Stress // *Plants*. 2020. V. 9. № 12. P. 1810 (<https://doi.org/10.3390/plants9121810>)
5. Bindschedler L. V., Minibaeva F., Gardner S. L., Gerrish C., Davies D. R., Bolwell G. P. Early Signalling Events in the Apoplastic Oxidative Burst in Suspension Cultured French Bean Cells Involve cAMP and Ca²⁺ // *New Phytol.* 2001. V. 151. № 1. P. 185–194.
6. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation // *Archives Biochem. Biophysic.* 1968. V. 125. P. 189–198.
7. Maslennikova D. R., Plotnikov A. A., Shakirova F. M. Comparative Analysis of the Physiological Effect of Nitric Oxide and 6-benzylaminopurine on the Components of the Glutathione Complex in the Roots of Wheat Seedlings // *Agrokhimiya*. 2019. № 3. P. 37. <https://doi10.1134/S0002188119030104>

Induction of drought tolerance in *Triticum aestivum* L. (wheat) plants of different agroecological groups by endophytic bacteria *Bacillus subtilis*

O. V. Lastochkina^{1*}, D. R. Maslennikova¹, D. Y. Garshina²

¹*Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Bashkir Research Institute of Agriculture UFRC RAS
19 Richard Zorge Street, 450059 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Email: oksanaibg@gmail.com

It has been established that an important contribution in endophytic bacteria *B. subtilis* 10-4-caused adaptation and drought tolerance of wheat plants - representatives of the steppe Volga (cv. Ekada70) and the forest-steppe West Siberian (cv. Salavat Yulaev) ecotypes is made by the ability of these bacteria to regulate the components of AsA-GSH complex and stabilize the oxidative status in plant cells under stress.

Keywords: *Triticum aestivum* L., ecotypes, drought, endophytic bacteria, *Bacillus subtilis*, plant-microbe interactions, H₂O₂, MDA, AsA-GSH complex, induced tolerance.

Влияние внеклеточного матрикса на активность транскрипционного фактора эпителиально-мезенхимального перехода Zeb1 при раке молочной железы

© А.П. Лобода^{1*}, Н.А. Барлев^{1,2}

¹*Московский Физико-Технический Институт
Долгопрудный, 141701, Россия*

²*Институт цитологии РАН
Санкт-Петербург, 194064 Россия*

*Email: a-p-loboda@yandex.ru

Метастазирование является лидирующей причиной смертности от рака молочной железы. Известно, что ключевую роль в метастазировании играет эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). Процесс ЭМП подвергается сложному, многоуровневому регулированию, в том числе с помощью транскрипционных факторов, важнейшим из которых является Zeb1. Известно, что при ЭМП происходит взаимная регуляция раковых клеток и внеклеточного матрикса (ВКМ). Работа посвящена поиску возможных молекулярных механизмов, лежащих в основе кооперации между Zeb1 и ВКМ при регуляции экспрессии генов в раке молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, транскрипционный фактор Zeb1, метастазирование.

Рак молочной железы (РМЖ) – одно из наиболее часто диагностируемых злокачественных онкологических заболеваний. Примерно 15–20% всех случаев РМЖ составляет трижды негативный молекулярный подтип. Он характеризуется существенно более слабым ответом на химиотерапию или гормональную терапию по сравнению с другими типами РМЖ, а также худшим клиническим прогнозом и высокой риском метастазирования [1].

Литературные данные свидетельствуют о том, что одной из основных причин метастазирования и возникновения резистентности к терапии при РМЖ является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [2][3]– обратимая генетическая программа, реализуемая в процессе эмбрионального развития и патологически активируемая при раке. Этот процесс сопровождается потерей межклеточных контактов, реорганизацией цитоскелета, а также повышенной подвижностью клеток и устойчивостью к терапии [4]. Программа ЭМП контролируется несколькими группами транскрипционных факторов (ЭМП-ТФ), среди которых Zeb1 – ключевой. Он играет центральную роль в осуществлении эпителиально-мезенхимального перехода [5].

Литературные данные свидетельствуют о том, что Zeb1-индуцированный ЭМП вовлечен во взаимное регулирование раковых клеток и внеклеточного матрикса (ВКМ), способствующее инвазии и метастазированию [6]. Также известно, что Zeb1 может участвовать в регуляции транскрипции генов, отвечающих за репарацию ДНК, вызывая устойчивость к противоопухолевой терапии [7]. Поиск возможных механизмов, лежащих в основе кооперации между Zeb1 и ВКМ при регуляции транскрипции генов, ответственных за репарацию ДНК, важен для более полного понимания процессов, проис-

ходящих при РМЖ, что в дальнейшем позволит значительно улучшить существующую терапию этого заболевания.

В настоящей работе методами иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР было показано влияние коллагена I типа, как модели ВКМ, на Zeb1-зависимую регуляцию экспрессии гена BRCA2, одного из ключевых участников гомологической репарации ДНК.

В работе использованы следующие клеточные модели:

- MCF-7 - клеточная линия РМЖ эпителиального типа. Так как в норме эта клеточная линия не экспрессирует Zeb1, с помощью лентивирусной трансдукции в них была введена индуцибельная система Tet-ON для эктопической экспрессии Zeb1 в ответ на обработку клеток доксициклином.
- MDA-MB-231 - клеточная линия РМЖ мезенхимального типа, в норме содержащая Zeb1 дикого типа.
- MDA-MB-231 Zeb1 KO - клеточная линия РМЖ мезенхимального типа с нокаутом Zeb1. Нокаут осуществлялся помощью лентивирусной трансдукции векторной конструкции, содержащей малые шпильковые РНК к Zeb1.

Для того, чтобы изучить влияние коллагена I типа на активность Zeb1, культуральные чашки покрывали стерильным водным раствором коллагена I типа различных концентраций (1 мг/мл и 2 мг/мл). Затем указанные выше клеточные линии инкубировали на коллагеновых чашках в течение трех дней (чашки без коллагена использовались в качестве негативного контроля). В клеточной линии MCF-7 экспрессию Zeb1 индуцировали с помощью добавления 1 мкг/мл доксициклина в среду в течение двух дней.

Данные ОТ-ПЦР показали, что индукция экспрессии Zeb1 в эпителиальных клетках РМЖ MCF-7, вызывала подавление транскрипции BRCA2 независимо от присутствия коллагена при любой его концентрации (рис.1).

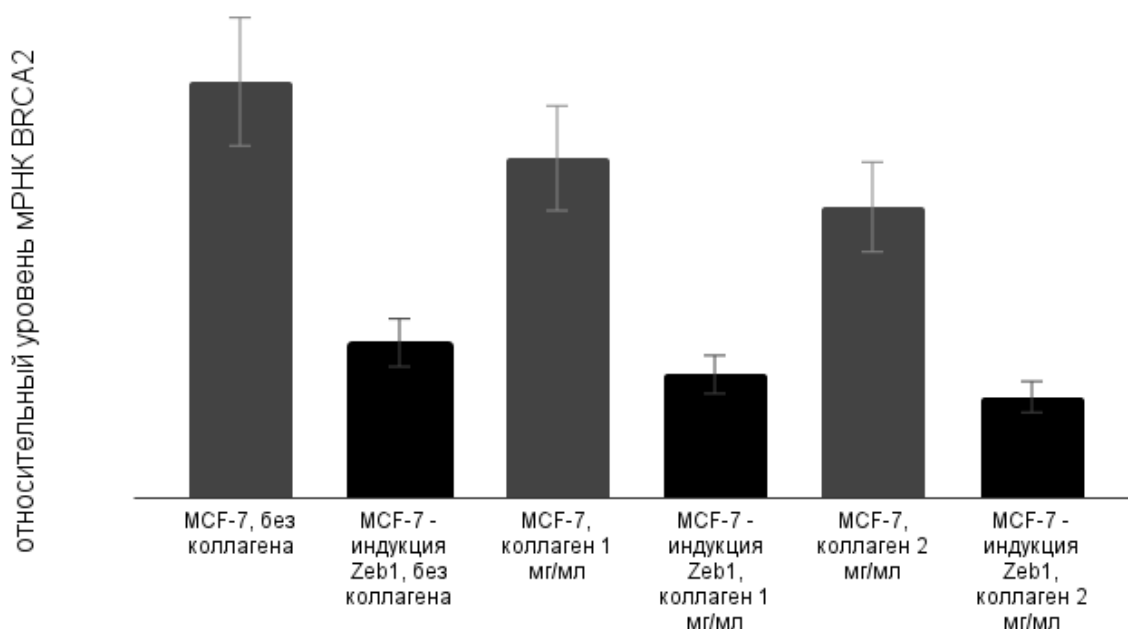


Рис.1. Данные ОТ-ПЦР, демонстрирующие изменение относительно контроля уровня мРНК BRCA2 в клетках MCF-7, инкубированных на обработанных коллагеном культуральных чашках. В качестве контроля использовались клетки MCF-7, инкубированные на чашке без коллагена и без индукции Zeb1.

В мезенхимальных клетках РМЖ MDA-MB-231 подавление экспрессии эндогенного Zeb1 приводило к восстановлению экспрессии BRCA2, также независимо от коллагена (рис. 2).

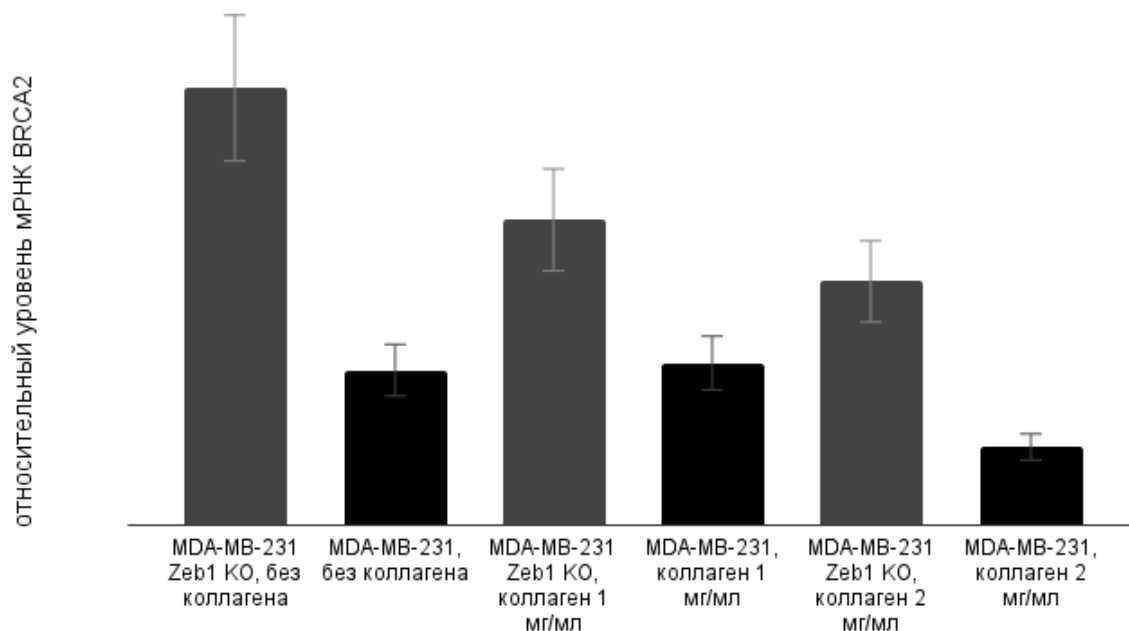


Рис. 2. Данные ОТ-ПЦР, демонстрирующие изменение относительно контроля уровня мРНК BRCA2 в клетках MDA-MB-231 и MDA-MB-231 Zeb1 KO, инкубированных на обработанных коллагеном культуральных чашках. В качестве контроля использовались клетки MDA-MB-231 Zeb1 KO, инкубированные на необработанной коллагеном культуральной чашке.

Данные иммуноблоттинга показали значительное различие между клетками MCF-7 и MDA-MB-231 в эффекте, оказываемом Zeb1 и коллагеном на количество белка BRCA2. Нам удалось показать, что белковый уровень BRCA2 зависит от коллагена гораздо сильнее, чем от Zeb1. В присутствии коллагена в мезенхимальных клетках РМЖ MDA-MB-231, содержащих Zeb1 дикого типа, происходит быстрая деградация BRCA2 по сравнению с клетками MDA-MB-231 KO (рис. 3).

MDA231

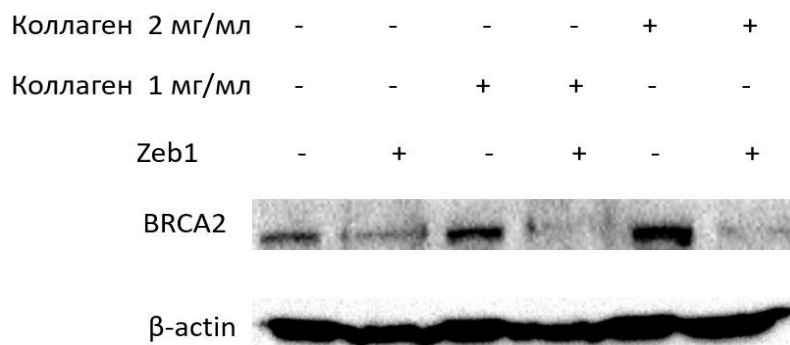


Рис. 3. Результаты иммуноблоттинга в клеточных линиях MDA-MB-231 и MDA-MB-231 Zeb1 KO, инкубированных в течение трех дней на культуральных чашках, обработанных растворами коллагена I типа различных концентраций.

Однако в эпителиальных клетках MCF-7 индукция экспрессии Zeb1 в присутствии коллагена, напротив, приводит к стабилизации BRCA2 (рис. 4).

MCF7

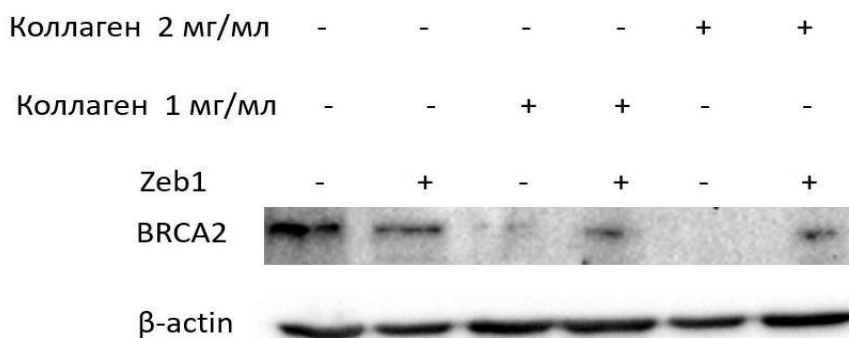


Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга в клеточной линии MCF-7, инкубированной в течение трех дней на культуральных чашках, обработанных растворами коллагена I типа различных концентраций.

Данные ОТ-ПЦР позволяют утверждать, что Zeb1 ингибирует экспрессию BRCA2 в обеих использованных клеточных линиях РМЖ. В дальнейших экспериментах следует установить, является ли этот эффект результатом действия Zeb1 непосредственно как

транскрипционного репрессора, так как подобная активность хорошо описана для этого белка [8].

Данные иммуноблоттинга показали, что белковый уровень BRCA2 зависит от коллагена гораздо сильнее, чем от Zeb1. Полученные результаты также указывают на различный механизм кооперации Zeb1 и коллагена в мезенхимальной клеточной линии MDA-MB-231 и эпителиальной MCF-7. В первом случае независимо от коллагена всех используемых концентраций активация Zeb1 приводила к значительному уменьшению количества белка BRCA2, что согласуется с данными ОТ-ПЦР и предполагает Zeb1-зависимую регуляцию транскрипции гена BRCA2. Однако в эпителиальной клеточной линии MCF-7 присутствие Zeb1 и коллагена, напротив, приводила к заметной стабилизации белка BRCA2, что предполагает наличие иного молекулярного механизма регуляции уровня BRCA2. Полученные данные, безусловно, требуют дальнейших исследований. Однако, так как в клетках MDA-MB-231 ген Trp53 несет доминантно-негативную мутацию R280K, а в MCF-7 присутствует p53 дикого типа [9], можно предположить, что p53, один из важнейших участников репарации ДНК, каким-то образом участвует в регуляции данного сигнального пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-15-00189.

Литература

1. Поздняков Д.Ю., Шувалов О.Ю., Барлев Н.А., Миттенберг А.Г. Транскрипционный фактор Zeb1: посттранскрипционная регуляция его активности в карциномах молочной железы человека // Цитология. – 2020. – Т. 62. – №. 1. – С. 3-15.
2. Wang Y., Zhou B. P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis //Chinese journal of cancer. – 2011. – Т. 30. – №. 9. – С. 603.
3. Gooding A. J., Schiemann W. P. Epithelial–Mesenchymal Transition Programs and Cancer Stem Cell Phenotypes: Mediators of Breast Cancer Therapy Resistance //Molecular Cancer Research. – 2020. – Т. 18. – №. 9. – С. 1257-1270.
4. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition //Nature reviews Molecular cell biology. – 2014. – Т. 15. – №. 3. – С. 178-196.
5. Zhang P., Sun Y., Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance //Cell cycle. – 2015. – Т. 14. – №. 4. – С. 481-487.
6. Peng D. H. et al. ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis //Oncogene. – 2017. – Т. 36. – №. 14. – С. 1925-1938.
7. Zhang P. et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1 //Nature cell biology. – 2014. – Т. 16. – №. 9. – С. 864-875.
8. Madany M., Thomas T., Edwards L. A. The Curious Case of ZEB1 //Discoveries. – 2018. – Т. 6. – №. 4.
9. Liu J. et al. The Expression of p53 Tumor Suppressor Gene in Breast Cancer Cell Is Down-Regulated by Cytokine Oncostatin M //Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research. – 1999. – Т. 10. – №. 10. – С. 677-684.

Effect of extracellular matrix on the activity of the epithelial-mesenchymal transition transcription factor Zeb1 in breast cancer cells

A.P. Loboda^{1*}, N. A. Barlev^{1,2}

¹*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701, Russia.*

²*Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, St-Petersburg, 194064. Russia.*

**Email: a-p-loboda@yandex.ru*

Metastasis is the leading cause of death caused by breast cancer. It is known that the key role in metastasis is played by the epithelial-mesenchymal transition (EMT). The EMT process undergoes complex regulation on different levels involving several transcription factors, the most important of which is Zeb1. It is known that during EMT there is a mutual regulation of cancer cells and the extracellular matrix (ECM). The present work is focused on the search for possible molecular mechanisms underlying the cooperation between Zeb1 and ECM in the regulation of gene expression in breast cancer.

Key words: breast cancer, epithelial-mesenchymal transition, Zeb1 transcription factor, metastasis

Влияние 24-эпибрассинолида на водный обмен растений пшеницы при дефиците воды

© А.Р. Лубянова, М.В. Безрукова, Ф.М. Шакирова

*Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
Россия, Уфа, 450054, Октября, 71, лит 1е*

Email: Lubyanova555@mail.ru

Исследовали влияние предпосевной обработки семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев 0.4 мкМ 24-эпибрассинолидом (ЭБ) на показатели водного обмена проростков в нормальных условиях и при обезвоживании, создаваемом 12% полиэтиленгликолем (ПЭГ). Выявлено, что предобработка ЭБ снижала потерю воды при действии 12% ПЭГ. Уменьшение стресс-индуцированной потери воды растениями происходило за счет регуляции процессов транспирации и накопления осмотически активных веществ.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., brassinостероиды, водный обмен, дефицит воды, оводненность, осмотический потенциал клеточного сока, относительное содержание воды, транспирация, 24-эпибрассинолид.

Среди абиотических стрессовых факторов, значительно снижающих урожайность сельскохозяйственных растений, часто наблюдается засуха. В стрессовых условиях окружающей среды растения, будучи прикрепленными к своему местообитанию, изменяют свои биохимические и физиологические процессы, направляя ресурсы на выживание. Характерными защитными реакциями растений при засухе, которые направлены на уменьшение потери воды растительным организмом, являются накопление осмотически активных веществ и закрытие устьиц. Значительное снижение транспирации и газообмена через устьица, в свою очередь, вызывает торможение фотосинтеза. При действии стрессовых факторов растения стремятся сохранить баланс и избежать не только блокирования процессов фотосинтеза, но и предотвратить потерю воды. Главными регуляторами, координирующими стресс-индуцированные физиологические и биохимические изменения, выступают фитогормоны, которые можно экзогенно применять для смягчения последствий воздействия стрессоров, в том числе и засухи, на метаболизм и рост растений. Хорошо известна ключевая роль АБК в реализации защитных механизмов в стрессовых условиях окружающей среды [1]. Наряду с этим активно исследуется участие brassinостероидов (БС) в реализации стресс-устойчивости растений [1, 2]. Известно, что регуляция движения устьиц имеет решающее значение для адаптации многих видов растений к произрастанию в изменчивых погодных условиях и контролируется комбинированным действием АБК и БС [3]. В наших экспериментах мы оценивали способность БС индуцировать и сохранять устойчивость водного обмена растений пшеницы к дефициту воды.

Исследования проводились в лабораторных условиях на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев. Семена замачивали в течение трех часов в растворе 0.4 мкМ 24-эпибрассинолида (ЭБ). Контрольные семена замачивали в дистиллированной воде. Растения выращивали при 16-часовом фотопериоде и освещенности 270

мкМ/(м²*с) ФАР в течение 8 суток на 10%-ной среде Хогланда-Арнона. В дальнейшем все проростки разделяли на две группы. Растения первой группы продолжали расти на 10%-ном растворе Хогланда-Арнона (контроль и (ЭБ)), растения второй группы переносили на 12% полиэтиленгликоля (ПЭГ), растворенный в 10%-ной среде Хогланда-Арнона (ПЭГ и (ЭБ)+ПЭГ). Каждый вариант эксперимента содержал 3-5 повторов.

Транспирацию определяли, анализируя потерю массы стаканчика с проростками в питательном растворе, поделенную на время между измерениями и количество проростков [4]. Для предотвращения испарения жидкости с поверхности сосудов проростки закрывали алюминиевой фольгой.

Оводненность корней определяли взвешиванием растительного материала сразу после отбора проб, сушки в открытых контейнерах, которые обеспечивают свободную циркуляцию воздуха, при температуре 70°С. Повторное взвешивание проводили через 24 часа после достижения постоянного веса при двух последовательных взвешиваниях. Содержание воды рассчитывали по формуле: оводненность = [(сырая масса - сухая масса)/сырая масса] × 100%.

Относительное содержание воды (ОСВ) в листьях рассчитывали по формуле: ОСВ=([сырая масса - сухая масса] / [масса при полном тургоре – сухая масса]) × 100%. Сырую массу определяли сразу после отделения листьев от растения. Для определения тургорной массы листья помещали при комнатной температуре на 24 ч в темноту в закрытые сосуды, погружая основанием в дистиллированную воду [5]. После определения массы при полном тургоре листья высушивали и рассчитывали ОСВ.

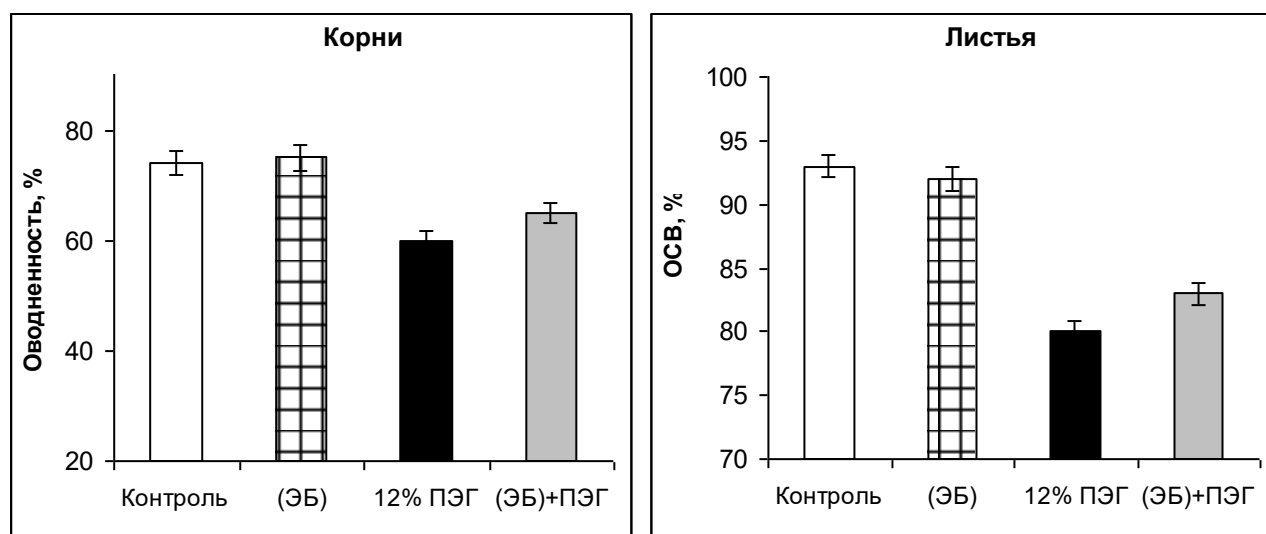


Рис. 1. Эффект предобработки 0.4 мкМ ЭБ на оводненность корней и относительное содержание воды (ОСВ) в листьях пшеницы при воздействии 12% ПЭГ. (ЭБ) – предпосевная обработка семян 24-эпибрассинолидом; ПЭГ – выдерживание в течение 5 ч проростков пшеницы на растворе 12% полиэтиленгликоля; (ЭБ)+ ПЭГ - предпосевная обработка семян 24-эпибрассинолидом с последующим выдерживанием 5 ч на 12% полиэтиленгликоле.

Осмотический стресс снижал оводненность корней на 14%, тогда как листья оказались более защищены и показатель ОСВ после 5 ч воздействия 12% ПЭГ снижался на 7% относительно контроля (рис. 1). В отсутствие стрессового воздействия предобработанные ЭБ проростки по показателям содержания воды в корнях и листьях не отличались от контрольных растений. В присутствии ПЭГ содержание воды предобработанных ЭБ листьев и корней растений пшеницы было на 3-5% выше, чем у ЭБ-необработанных проростков.

Накопление осмотически активных веществ в растениях - характерная реакция стремящихся удержать воду растений в ответ на дефицит воды в окружающей среде. В наших экспериментах предпосевная обработка семян ЭБ не повлияла на накопление осмотически активных веществ проростков пшеницы в оптимальных условиях произрастания, однако после 24 ч воздействия 12% ПЭГ наблюдалось уменьшение осмотического потенциала клеточного сока на 80% относительно контрольных растений (рис. 2). Показатель осмотического потенциала клеточного сока растений пшеницы, семена которых перед посевом предобработали ЭБ, был выше на 30% на фоне стресса, чем у необработанных ЭБ стрессированных растений.

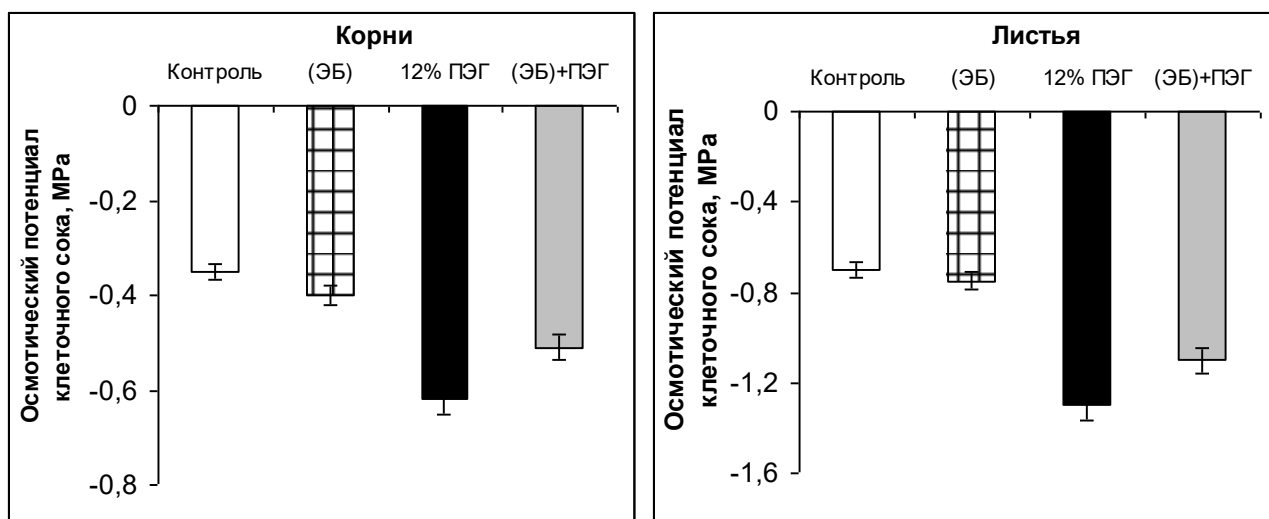


Рис. 2. Влияние предпосевной обработки семян 0.4 мкМ ЭБ на осмотический потенциал корней и листьев 9-суточных проростков пшеницы после воздействия 12% ПЭГ. (ЭБ) – предобработка 24-эпибрассинолидом; ПЭГ – выдерживание в течение 24 ч проростков пшеницы на растворе 12% полиэтиленгликоля; (ЭБ)+ ПЭГ - предпосевная обработка семян 24-эпибрассинолидом с последующим выдерживанием 24 ч на 12% полиэтиленгликоле.

Значимых отличий у листьев ЭБ-предобработанных проростков пшеницы от контрольных значений по уровню транспирации не было (рис. 3). Осмотический стресс, вызванный присутствием в среде Хогланда-Арнона 12% ПЭГ, приводил к резкому снижению уровня транспирационных потерь воды на 30% по сравнению с контрольными растениями уже в первый час воздействия стрессора. К 5 часам воздействия обезвоживания наблюдалось двукратное сокращение транспирации. Предпосевная обработка ЭБ при последующем воздействии 12% ПЭГ на 20% увеличивала транспирацию листьев пшеницы по сравнению с только стрессированными растениями.

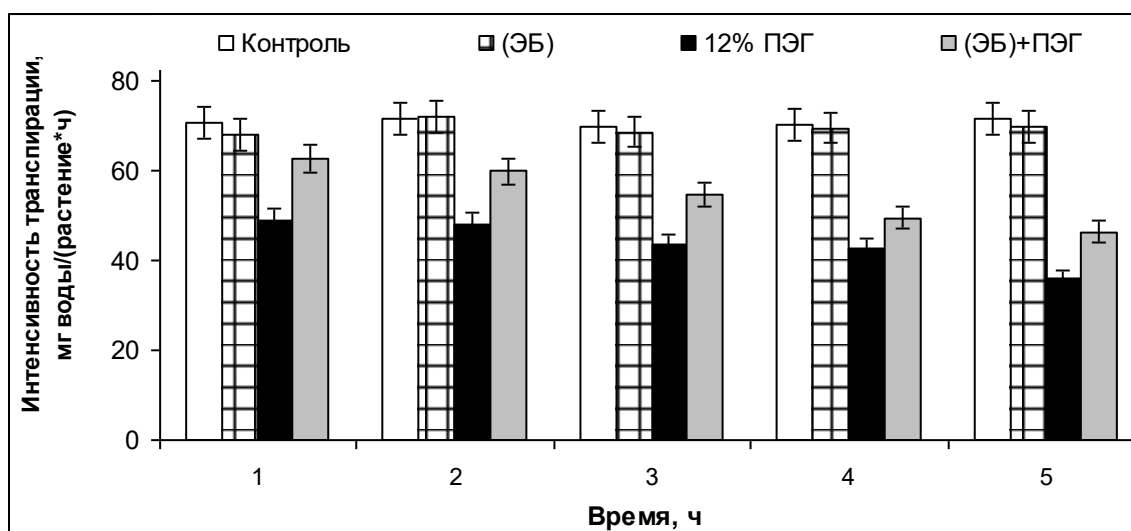


Рис. 3. Интенсивность транспирации растений пшеницы, выращенных из предобработанных и необработанных 0.4 мкМ ЭБ семян в условиях осмотического стресса. (ЭБ) – предпосевная обработка 24-эпибрасинолидом; ПЭГ - выдерживание в течение 5 ч проростков пшеницы на растворе 12% полиэтиленгликоля; (ЭБ)+ПЭГ - предпосевная обработка семян 24-эпибрасинолидом с последующим выдерживанием 5 ч на 12% полиэтиленгликоле.

Полученные данные свидетельствуют о том, что предпосевная обработка семян 0.4 мкМ 24-эпибрасинолидом оказывает защитный эффект, смягчая последующее влияние дефицита воды на водный обмен растений пшеницы, что отражается на таких показателях, как содержание воды и накопление осмотически активных веществ в проростках пшеницы, а также транспирации листьев.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (20-04-00904а) и частично в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А16-116020350029-1) с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

Литература

1. Eyidogan F., Oz M.T., Yucel M., Oktem H.A. Signal Transduction of Phytohormones Under Abiotic Stresses // *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 2012. P. 1-48. DOI: 10.1007/978-3-642-25829-9.
2. Hola D. Role of Brassinosteroids in the Plant Response to Drought: Do We Know Anything for Certain? // *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019. P. 101-168. DOI: 10.1007/978-981-13-6058-9.
3. Ha Y.M., Dami Y.S., Nam K.H. Brassinosteroid Reduces ABA Accumulation Leading to the Inhibition of ABA-induced Stomatal Closure // *Biochem. Biophys. Research Commun.* 2018. V. 504. P. 143-148. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.146

4. Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Тимергалин М.Д., Wilkinson S. Влияние ингибитора рецепции этилена на рост, водный обмен и содержание абсцизовой кислоты у растений пшеницы при дефиците воды // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 619-626.
5. Pardossi A., Vernieri P., Tognoni F. Involvement of Abscisic Acid in Regulating Water Status in *Phaseolus vulgaris* L. during Chilling // Plant Physiol. 1992. V. 100. P. 1243-1250. DOI: 10.1104/pp.100.3.1243.

Effect of 24-epibrassinolide on water exchange in wheat plants under water deficit

A.R. Lubyanova¹, M.V. Bezrukova¹, F.M. Shakirova¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, October Pr., 71 lit. 1e.*

*Email: Lubyanova555@mail.ru

The pre-sowing treatment of wheat seeds (*Triticum aestivum* L.), cultivar Salavat Yulaev by 0.4 μ M 24-epibrassinolide (EB) influenced on water exchange of wheat seedlings under normal growth conditions and under water deficit, modulated by an osmotic - 12% polyethylene glycol (PEG). It was revealed that EB-pretreatment reduced water loss of seedlings under 12% PEG treatment. The decrease in stress-induced water loss by the plant occurred due to regulation the processes of transpiration and accumulation of osmotically active substances.

Keywords: *Triticum aestivum* L., brassinosteroids, water exchange, water deficit, water content, osmotic potential of cell sap, relative water content, transpiration, 24-epibrassinolide.

Роль глутатион-S-трансфераз в растениях семейства Капустных

© Е.В. Михайлова, М.Ю. Шеин, В.Ю. Алексеев

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450075 г. Уфа, проспект Октября, 71

Email: mikhele@list.ru

Обсуждается возможность повышения устойчивости растений семейства капустных к мучнистой росе и другим стрессовым факторам путем гетерологичной экспрессии генов глутатион-S-трансфераз.

Ключевые слова: рапс, *Brassicaceae*, *Brassica napus*, GST, GSH, мучнистая роса, *Erysiphe cruciferarum*, *Erysiphe communis*

К растениям семейства Капустных (*Brassicaceae*) относятся ценные сельскохозяйственные культуры, которые используются в качестве овощных, масличных, сидератов и фиторемедиаторов: репа, пекинская капуста, редька, брюква, множество подвидов капусты (кочанная, цветная, брокколи, кольраби и др.), горчица белая, горчица сарептская, руккола, и самая популярная культура – рапс. Рапс *Brassica napus* L. является гибридом репы *B. rapa* и капусты *B. oleracea*. Гибридизация играет огромное значение в эволюции и видообразовании Капустных [1].

Помимо средиземноморской рукколы, остальные культуры являются чрезвычайно устойчивыми к неблагоприятным абиотическим факторам. Особенно отличаются они холодостойкостью, что позволяет успешно культивировать их в умеренных широтах [2]. Основную угрозу урожаям этих культур представляют насекомые-вредители и грибные заболевания. Жуки семейства листоедов (рапсовый цветоед, рапсовый листоед, крестоцветная блошка и др.), тля, капустная моль способны нанести существенный вред урожаю. Наиболее опасные заболевания, которыми рапс поражается на протяжении всего жизненного цикла, вызываются грибами четырех классов (*Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Oomycetes* и *Ascomycetes*) [3]. Из этих заболеваний следует отдельно выделить мучнистую росу (*Erysiphe cruciferarum*), которая, в отличие от большинства остальных грибов, проявляет себя в конце лета, при чередовании влажной и засушливой погоды, и поражает широкий спектр растительных семейств: *Capparidaceae*, *Brassicaceae*, *Resedaceae*, *Papaveraceae*, *Fumariaceae* [4]. Сорта рапса, устойчивые к мучнистой росе, до сих пор не были получены ни путем традиционной селекции, ни методами генной инженерии [5]. Единственным на данный момент методом борьбы с ними остается обработка семян и посевов фунгицидами.

Еще одним уникальным свойством мучнистой росы является облигатная биотрофность и, как следствие, невозможность её культивирования на питательных средах [6]. Этим объясняется то, что из множества растительных патогенов мучнистая роса – один из наименее хорошо изученных. Грибы *Erysiphe* не представлены ни в одной коллекции. Тем не менее, геномы соответствующих патогенов винограда, кизила, бобовых растений уже были секвенированы. Генетически *Erysiphe cruciferarum* с высокой достоверностью выделяется в отдельную группу, наиболее близкородственную видам грибов *E. buhrii* и *E. betae*, паразитирующих на Гвоздичных, в частности на свекле (рис. 1).

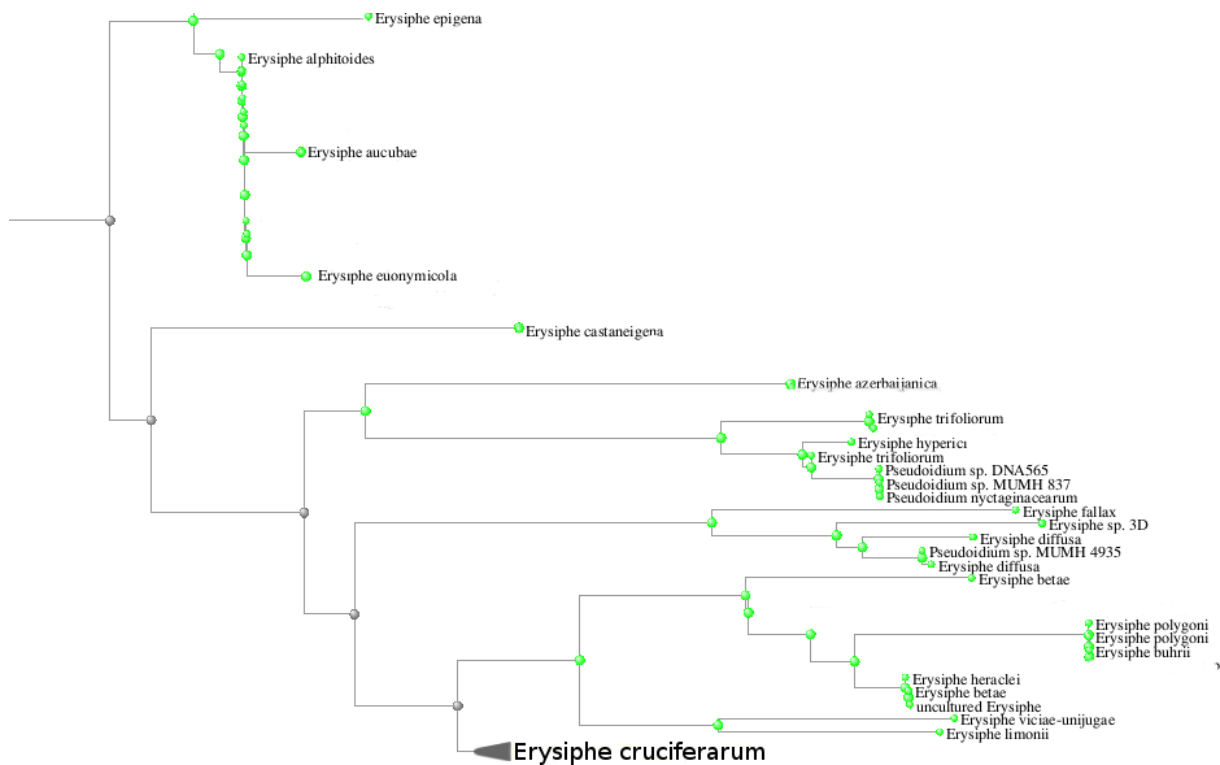


Рис. 1. Филогенетическое дерево грибов рода *Erysiphe*, построенное с использованием BLAST pairwise alignments

Одним из важнейших соединений, задействованных в обеспечении устойчивости растений к стрессам, являются глутатион (GSH) и катализирующая реакции с его участием глутатион-S-трансфераза (GST). GST могут выполнять роль GSH-трансфераз, GSH-зависимых пероксидаз, GSH-зависимых изомераз и GSH-зависимых оксидоредуктаз. Вместе они принимают участие в хелатировании тяжелых металлов [7], нейтрализации токсичных ксенобиотиков [8]. Показана связь повышенной экспрессии генов *GST* в устойчивости к экстремальным температурам [9], засолению [10], гербицидами и заражению мучнистой росой [11,12]. Тогда как в арабидопсисе известны 53 различные глутатион-S-трансферазы, а в капусте *Brassica oleracea* — 65, то в рапсе идентифицировано 179 генов *GST*, в том числе 141 из них - дублицированные [13]. Почти у половины дублицированных генов характер экспрессии различался. Конкретные функции каждого из множества генов *GST* ни в одном из этих видов растений до сих пор не известны. Изучение конститутивной гетерологичной экспрессии конкретных генов в растениях, созданных методами генной инженерии и геномного редактирования, является одним из лучших способов не только узнать больше о роли этих генов, но и получить ценные сельскохозяйственные растения с повышенной стрессоустойчивостью. Особенный интерес представляет создание растений рапса [14], сверхэкспрессирующих гены *GST* и оценка изменения реакции таких растений на различные виды стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта МК-1146.2020.11 и частично в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4).

Литература

1. Mikhaylova E. V., Kuluev B. R. Potential for gene flow from genetically modified *Brassica napus* on the territory of Russia //Environmental monitoring and assessment. 2018. V. 190. No. 9. P. 557. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6946-2>
2. Михайлова Е.В., Денисов А.М. Перспективы внедрения в сельскохозяйственное производство биотехнологических сортов рапса // Аграрная Россия. 2017. №7. С. 15-24.
3. Пивень В. Т., Сердюк О. А. Фитосанитарный мониторинг болезней рапса //Масличные культуры. 2011. №. 2. С. 148-149.
4. Гасич Е. Л., Хлопунова Л. Б., Бекиш Л. П. Грибные болезни рапса в Северо-Западном регионе //Земледелие. 2009. №. 2.
5. Артамонов А. А., Горшков В. И. Болезнеустойчивые сорта ярового рапса //Земледелие. 2009. №. 2. С. 45-46
6. Vogel J. P., Raab T. K., Somerville C. R., Somerville S. C. Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition //The Plant Journal. 2004. V. 40. No. 6. P. 968-978.
7. Pilon-Smits E. Phytoremediation //Annu. Rev. Plant Biol. 2005. V. 56. P. 15-39.
8. Marrs K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants //Annual review of plant biology. 1996. V. 47. No. 1. P. 127-158.
9. Kouno T., Ezaki B. Multiple regulation of Arabidopsis AtGST11 gene expression by four transcription factors under abiotic stresses //Physiologia plantarum. 2013. V. 148. No. 1. P. 97-104.
10. Csiszár J. et al. Glutathione transferase supergene family in tomato: salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid //Plant Physiology and Biochemistry. 2014. V. 78. P. 15-26.
11. Mauch F., Dudler R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack //Plant Physiology. 1993. V. 102. No. 4. P. 1193-1201.
12. Wang J. M. et al. Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using GeneChip //Molecular biology reports. 2012. V. 39. No. 1. P. 381-387.
13. Wei L. et al. Genome wide identification and comparative analysis of glutathione transferases (GST) family genes in *Brassica napus* //Scientific reports. 2019. V. 9. No. 1. P. 1-13.
14. Михайлова Е.В., Кулуев Б.П. Создание трансгенного рапса (*Brassica napus* L.) с конститутивной экспрессией гена ARGOS-LIKE *Arabidopsis thaliana* методом погружения цветков // Биотехнология. 2015. №5. С. 49-58.

The role of glutathione-S-transferases in *Brassicaceae* plants

E.V. Mikhaylova, M. Yu. Shein, V.Yu. Alexeev

*Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS
71 Prospekt Oktyabrya, 450075 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia*

Email: mikhele@list.ru

The possibilities to increase stress-tolerance of oilseed rape to powdery mildew and other stress factors by heterologous expression of glutathione-S-transferase genes are discussed.

Keywords: oilseed rape, *Brassicaceae*, *Brassica napus*, GST, GSH, powdery mildew, *Erysiphe cruciferarum*, *Erysiphe communis*

Изучение механизмов ингибирования холинэстераз высокими концентрациями положительно заряженных субстратов при конкурирующей кинетике

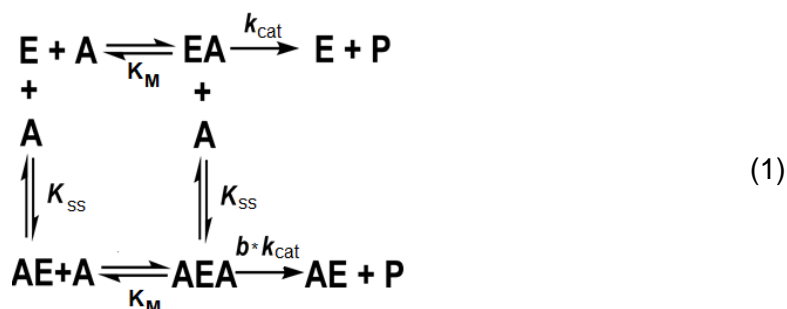
© Мухаметгалиева А.Р.^{*}, Массон П.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Россия, Республика Татарстан, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

^{*}Email: aliya_rafikovna@mail.ru

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, типы ингибирования

Положительно заряженные субстраты холинэстераз (ХЭ) не подчиняются михаэлевскому поведению при взаимодействии высоких концентраций из-за активации / ингибирования фермента [1; 2]. Такое каталитическое поведение описывается моделью Вебб-Радича (1). Так как каталитический центр связан с периферическим анионным сайтом (ПАС) с помощью Ω -петли, при взаимодействии избытка субстрата с ПАС происходит аллостерическое взаимодействие и, как следствие, изменяется активность ХЭ (константа k_{cat} преобразуется в $b \cdot k_{cat}$).

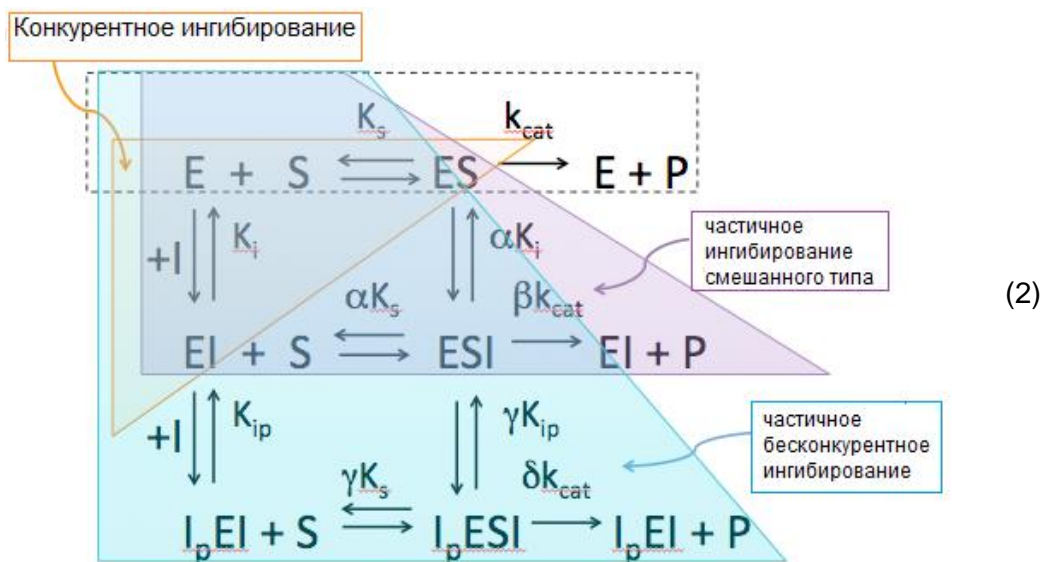


Так как среди природных лигандов положительно заряженным является нейромедиатор ацетилхолин, гидролизуемый ацетилхолинэстеразой (АХЭ), а в некоторых случаях и бутирилхолинэстеразой (БХЭ) [3], данное исследование направлено на изучение выявления механизмов нежелательных конкурирующих взаимодействий (например, с совместно вводимыми лекарственными средствами). Целью работы являлось, установить влияние аллостерического эффекта, вызванного связыванием второй молекулы ацетилтиохолина, как положительно заряженного субстрата, с ПАС АХЭ и БХЭ при конкурирующей кинетике.

Гидролиз сложных эфиров (тио)холина сопровождается двуступенчатым процессом: образование ацилферментного комплекса и деацилирование ацилферментного комплекса [4]. Чтобы изучить воздействие высоких концентраций положительно заряженных субстратов на механизмы ацилирования и деацилирования и описать механизмы активации/ингибирования, мы использовали пару фенилацетат и ацетилтиохолин, в качестве пары конкурирующих субстратов. Оба исследуемых субстрата имеют ацильный фрагмент – уксусную кислоту, поэтому константа скорости деацилирования для обоих субстратов была одинаковой.

Кинетическое поведение нехромогенного в ходе анализа субстрата — ацетилтихолина определяли по гидролизу репортерного субстрата — фенилацетата, так как два субстрата будут конкурировать за связывание в активном центре фермента. При использовании широких диапазонов концентраций конкурирующих субстратов было установлено 3 случая ингибирования с помощью кинетики в стационарных условиях (графики Диксона и Корниша-Боудена) [5] и с помощью метода конкурирующих субстратов [6].

Гидролиз фенилацетата в присутствии различных концентраций ацетилтихолина показал последовательное переключение в связывании субстратов в активном сайте ХЭ. Для обоих ферментов при низких концентрациях ацетилтихолина (0,025-0,2мМ) наблюдали конкурентное ингибирование; при средних концентрациях ацетилтихолина (0,5-1,8мМ) было выявлено частично смешанное ингибирование; при высоких концентрациях ацетилтихолина (2-10мМ) было показано частично бесконкурентное ингибирование. Три фазы ингибирования в зависимости от концентрации конкурента можно описать следующей схемой (2) [7]:



Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект 20-14-00155).

Литература

1. Masson P. и др. Role of Aspartate 70 and Tryptophan 82 in Binding of Succinylthiocholine to Human Butyrylcholinesterase // *Biochemistry*. 1997. Т. 36. № 8. С. 2266–2277. doi: 10.1021/bi962484a.
2. Radic Z. и др. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors // *Biochemistry*. 1993. Т. 32. № 45. С. 12074–12084. doi: 10.1021/bi00096a018.
3. Duysen E. G. и др. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (–)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer’s disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission // *Toxicology*. 2007. Т. 233. № 1. С. 60–69. doi: 10.1016/j.tox.2006.11.069.

4. Zhang Y., Kua J., McCammon J.A. (2002) Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 10572—10577. doi: 10.1021/ja020243m.
5. Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors (Short Communication) // *Biochem J.* 1974. Т. 137. № 1. С. 143–144. doi:10.1042/bj1370143
6. Mukhametgalieva A. R. и др. Time-course of human cholinesterases-catalyzed competing substrate kinetics // *Chemico-Biological Interactions.* 2019. Т. 310. С. 108702. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.015.
7. Mukhametgalieva A. R. и др. Steady-state kinetic analysis of human cholinesterases over wide concentration ranges of competing substrates // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2021 (в печати).

Изучение разнообразия водорослей в почвах под растительностью с Бамбучником на острове Итуруп с использованием молекулярно-генетического подхода

© А.Ю. Никулин^{1*}, В.Б. Багмет¹, В.Ю. Никулин¹, Ш.Р. Абдуллин¹

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН

Россия, Приморский край, 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159.

*Email: artyrozz@mail.ru

Получены первые данные по биоразнообразию водорослей в почвах под растительностью с Бамбучником – *Sasa kurilensis* (Rupr.) Makino & Shibata на о. Итуруп с применением классических альгологических и молекулярно-генетических методов. Обнаружено 13 видов водорослей, относящихся к 10 родам, 10 семействам, 7 порядкам, 4 классам и 3 отделам: Bacillariophyta – 3 вида, Ochrophyta – 3 вида, Chlorophyta – 7 видов. Ареалы выявленных видов зачастую очень обширны или еще не до конца установлены. Низкое видовое богатство изученных проб связано, по-видимому, с сильной затененностью местообитаний с Бамбучником.

Ключевые слова: биоразнообразие, почвенные водоросли, полифазный подход, *Sasa kurilensis*, остров Итуруп.

Природа Курильских островов представляет большой интерес для исследования биоразнообразия своей изолированностью от континента и влиянием умеренно холодного муссонного климата. На этих островах проводились исследования пресноводных водорослей [1, 2, 3]. При этом таксономическое разнообразие почвенных водорослей на острове Итуруп остается практически не изученным. Известна лишь работа К. В. Ильчибаевой с соавторами [4], посвященная предварительным сведениям о цианобактериях и водорослях вулканических почв Курильских островов. В 12 пробах было выявлено 23 вида цианобактерий и водорослей: Cyanobacteria – 5 видов, Bacillariophyta – 5 видов, Ochrophyta (Xanthophyceae – 1), Chlorophyta (Chlorophyceae – 11, Trebouxiophyceae – 1). Бамбучник (*Sasa kurilensis*) произрастает на Сахалине и Курильских островах, часто образуя непроходимые заросли на склонах гор и опушках лесов. Почвы под исследуемыми сообществами – дерново-перегнойные охристые буроземы. Их отличительной чертой является высокая гумусированность. Это также характерно для почв фитоценозов под каменноберезовыми лесами с дубом курчавым и ольхой волосистой. Кроме того, в почвах под лесными экосистемами отмечены более низкие значения pH и валового содержания основных оксидов по сравнению с почвами луговых сообществ [5, 6]. При этом вполне вероятно, что в почвах под Бамбучником могут образовываться уникальные ценозы микроорганизмов, включая и водоросли, которые ранее под растительными сообществами с *S. kurilensis* не исследовались. Поэтому цель нашей работы – анализ биоразнообразия водорослей почв острова Итуруп под растительными сообществами с Бамбучником.

С 27.07.2018 по 05.08.2018 в шести точках, расположенных в центральной части острова и включающими растительные сообщества с *Sasa kurilensis* были отобраны пробы почвы по общепринятой методике [7].

Клетки изучали с использованием светового микроскопа (Olympus BX 53 (Japan), оборудованного оптикой Nomarski DIC и цифровой камерой Olympus DP27), а также сканирующей электронной микроскопии (СЭМ; Merlin, Carl Zeiss, Germany). Для идентификации выделенных штаммов водорослей определялись последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера ядерной рибосомной ДНК (ITS-региона ярДНК). Все вновь полученные последовательности были помещены в GenBank под регистрационными номерами MW013805–MW013816 и сравнивались с другими штаммами, доступными с помощью поиска BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [8]).

Всего выявлено 13 видов водорослей, относящихся к 10 родам, 10 семействам, 7 порядкам, 4 классам и 3 отделам: Bacillariophyta – 3 вида, Ochrophyta – 3 вида, Chlorophyta – 7 видов (табл.). Три вида удалось идентифицировать лишь до рода, для дальнейшего уточнения их таксономической принадлежности необходимы дополнительные исследования. Наиболее часто встречался вид *Coelastrella aeroterrestica* Tschalkner, Gärtner & Kofler (F = 67%). Большинство видов отмечено лишь единично. Число видов в пробе было низким и варьировало от 2 до 5 (табл.).

В трех пробах почвы обнаружено три вида Bacillariophyta (табл.). В точках 3 и 5 отмечен *Humidophila contenta* (Grunow) Lowe, Kociolek, J.R. Johansen, Van de Vijver, Lange-Bertalot & Korálová – повсеместно встречающийся вид, обитающий в пресных водах, наземных местообитаниях и в привходовых частях пещер [9, 10]. Данный таксон отмечен и в России, и на территории Российского Дальнего Востока (РДВ). На острове Итуруп ранее был выявлен в пресноводных местообитаниях [2]. *Mayamaea arida* (Bock) Lange-Bertalot – пресноводный вид, аэрофил, отмечен в бентосе биотопов с низкой pH, развивается в сфагновых болотах и на мхах. Является новым видом для Российского Дальнего Востока (РДВ). *Mayamaea fossalis* (Krasske) Lange-Bertalot – аэрофил, предпочитает увлажненные местообитания, в частности, почвы, а также временные водоемы, распространен в Голарктике. На острове Итуруп ранее не отмечался.

Отдел Ochrophyta был представлен тремя видами (табл.), два из которых относятся к роду *Vischeria*: *Vischeria magna* (Petersen) Kryvenda, Rybalka, Wolf & Friedl (рис. 2г; два генетически идентичных штамма: MW013812 и MW013815 из проб 4 и 5 соответственно и *V. vischeri* (Hibberd) Kryvenda, Rybalka, Wolf & Friedl (проба 2; MW013808; табл.). Оба вида широко распространены в разнотипных почвах и аэрофитных местообитаниях, и для них отмечено большое число находок на территории бывшего СССР, включая Дальний Восток и Курильские острова [4, 11]. На острове Итуруп ранее виды не отмечались. *Monodopsis subterranea* (J.B. Petersen) D.J. Hibberd встречается в разных типах почв. Данный таксон выявлен в России, включая Приморский край, Дании, территории бывшей Чехословакии, Румынии, Антарктике. На острове Итуруп ранее не отмечался.

Из отдела Chlorophyta были выявлены семь видов (табл.). *Chlamydomonas* sp. - потенциально новый вид, характеризующийся низкой идентичностью ITS-региона ярДНК по результатам BLAST (89%). По морфологическим данным вид также однозначно принадлежит *Chlamydomonas*. Требуется дальнейшее изучение жизненного цикла штамма, получение дополнительных фрагментов ярДНК для описания нового таксона.

Таблица. Таксономический состав водорослей из проб почв под сообществами с Бамбучником (остров Итуруп, Сахалинская область)

№	Таксон	% идентичности	Номер пробы					
			1	2	3	4	5	6
			Географические координаты					
			45.208 N, 147.918 E	45.258 N, 147.919 E	45.160 N, 147.777 E	45.160 N, 147.777 E	45.262 N, 147.958 E	45.225 N, 147.883 E
	Bacillariophyta							
	Bacillariophyceae							
	<u>Naviculales</u>							
	<i>Diadesmidaceae</i>							
1.	<i>Humidophila contenta</i>			+		+		
	<i>Naviculales incertae sedis</i>							
2.	<i>Mayamaea arida</i>					+		
3.	<i>Mayamaea fossalis</i>						+	
	Ochrophyta							
	Eustigmatophyceae							
	<u>Eustigmatales</u>							
	<i>Eustigmataceae</i>							
4.	<i>Vischeria magna</i>	99				MW013812	MW013815	
5.	<i>Vischeria vischeri</i>	99.88		MW013808				
	<i>Monodopsidaceae</i>							
6.	<i>Monodopsis subterranea</i>	99				MW013813		
	Chlorophyta							
	Chlorophyceae							
	<u>Chlamydomonadales</u>							
	<i>Chlamydomonadaceae</i>							
7.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	89			+			
	<u>Sphaeropleales</u>							
	<i>Scenedesmaceae</i>							
8.	<i>Coelastrella aeroterrestica</i>	99.86	MW013805	MW013807 MW013806	MW013810		MW013816	
9.	<i>Coelastrella oocystiformis</i>	99.47			MW013809			
	<i>Bracteacoccaceae</i>							
10.	<i>Bracteacoccus</i> sp.	85.4	+					
	Trebouxiophyceae							
	<u>Trebouxiiales</u>							
	<i>Trebouxiaceae</i>							
11.	<i>Parietochloris pseudoalveolaris</i>	99.81				MW013814		
	<u>Trebouxiophyceae ordo incertae sedis</u>							
	<i>Coccomyxaceae</i>							
12.	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	99			MW013811			
	<u>Prasiolales</u>							
	<i>Stichococcaceae</i>							
13.	<i>Stichococcus</i> sp.	95.5	+					
	Всего видов:		3	2	5	3	3	
							2	

Coelastrella aeroterrestica – всего выделено 5 штаммов из 4 проб (MW013805–MW013807, MW013810, MW013816; табл.). Три штамма (MW013805, MW013810, MW013816; точки 1, 3, 6 соответственно) оказались идентичны друг другу (табл., рис. 1). Еще два штамма генетически незначительно отличаются от вышеуказанных – MW013806 (1 замена) и MW013807 (3 замены, одна делеция) и между собой (2 замены, одна делеция), причем оба они были из одной пробы, отобранной в точке 2 (табл.). Отмечена высокая встречаемость данного вида в пробах (треть от всех выделенных штаммов) и наличие 2-х генотипов *Coelastrella aeroterrestica* в одной почвенной пробе. Данный вид наземных водорослей ранее выявлен в Европе, а также в России. Является новым видом для РДВ. *Coelastrella oocystiformis* (J.W.G.Lund) E.Hegewald & N.Hanagata – 1 штамм из одной пробы (точка 3; MW013809; табл.). Вид широко распространен: Англия, Чехия, Китай, Корея, Россия. Является новым видом для РДВ. *Bracteacoccus* sp. – второй потенциально новый вид, характеризующийся низкой иден-

тичностью ITS-региона ярдНК по результатам BLAST (85,4%). Один штамм *Parietochloris pseudoalveolaris* (T.R.Deason & Bold) Shin Watanabe & G.L.Floyd in Deason, Silva, Watanabe & Floyd (MW013814; табл.). Вид широко распространен и выявлен в почвах Украины, Швеции, Чили, США, Тайваня и России. Является новым видом для Сахалинской области и о. Итуруп. *Coccomyxa subellipsoidea* E.Acton – один штамм из одной пробы (точка 3; MW013811; табл.). Вид широко распространен и отмечен в Европе, Африке, Северной Америке и даже в Антарктике. Однако в России он ранее не отмечался. *Stichococcus* sp. – третий потенциально новый вид, с низкой идентичностью по ITS-региону ярдНК (95,9%).

Таким образом, использование молекулярных данных (анализ нуклеотидных последовательностей ITS-региона ярдНК) позволило достоверно определить видовую принадлежность 7 штаммов и выявить 3 потенциально новых вида, требующих дополнительного исследования. Использование сканирующей электронной микроскопии позволило определить 3 вида диатомей, а применение световой микроскопии – подтвердить правильность идентификации всех остальных штаммов водорослей. Ареалы выявленных видов зачастую очень обширны или еще не до конца установлены. Расстояние между некоторыми ранними находками и о. Итуруп составляет порядка десятка тысяч километров, что позволяет говорить о практически космополитном распространении некоторых видов водорослей (например, *Coccomyxa subellipsoidea*, *Coelastrella aeroterrestica*). В то же время в одной пробе могут встретиться два генетически дивергентных штамма одного вида (*Coelastrella aeroterrestica*). В результате сравнения предыдущего исследования вулканических почв острова Итуруп [4] с полученными данными было отмечено более низкое число выявленных видов (23 и 13 видов соответственно), отсутствие представителей цианобактерий и Xanthophyceae, наличие водорослей класса Eustigmatophyceae, отсутствие общих видов. При этом в обоих случаях доминировали представители отдела Chlorophyta (12 и 7 видов соответственно). Возможно, такие отличия обусловлены разными экологическими условиями изученных местообитаний: тип почвы, состав высшей растительности и т.д.

Известно, что от характера наземной растительности в значительной степени зависит состав и количество почвенных цианобактерий и водорослей, выступающих как составные части лесных экосистем. В частности, высшими растениями определяется световой режим в лесу. Недостаток света, связанный с густым растительным покровом или наличием мощной подстилки обуславливает снижение развития цианобактерий и водорослей в почвах [12, 13]. Именно поэтому, вероятно, низкое видовое богатство водорослей в изученных пробах почвы под Бамбучником связано, в первую очередь, с сильной затененностью местообитания, так как этот вид высших растений образует очень густой травостой, а также с большим количеством листового и стеблевого опада на почве. Возможно, на видовой состав повлиял также и тип почвы (дерново-перегнойные охристые буроземы), однако уточнение этого вопроса требует дальнейших исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00196, <https://rscf.ru/project/21-14-00196/>

Литература

1. Барина С. С. Пресноводные диатомовые водоросли Курильских островов. В кн.: Систематика и экология речных организмов. Владивосток: ДВО АН СССР. 1989. С. 138–141.
2. Медведева Л. А., Никулина Т. В. Каталог пресноводных водорослей юга Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука. 2014. С. 271.
3. Штина Э. А., Андреева В. М., Кузякина Т. И. Заселение водорослями вулканических субстратов // Ботанический журнал. 1992. Т. 77. № 8. С. 33–42.
4. Ilchibaeva K. V., Kunsbaeva D. F., Allaguvatova R. Z., Fazlutdinova A. I., Polokhin O. V., Sibirina L. A., Gontcharov A. A., Singh P., Gaysina L. A. Preliminary data about algae and cyanobacteria of volcanic soils on Kuril Islands // Theor. Appl. Ecol. 2018. V. 4. P. 119–126.
5. Костенков Н. М., Ознобихин В. И. Почвенно-географическое районирование Курильских островов // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2011. № 1. С. 77–83.
6. Полохин О. В., Сибирина Л. А. Почвенный и растительный покров острова Итуруп (Курильские острова) // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 5. С. 618.
7. Голлербах М. М., Штина Э. А. Почвенные водоросли. Л.: Наука. 1969. С. 228.
8. База данных BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine // [Электронный ресурс]. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 14.07.2021).
9. Abdullin Sh. R. Cyanobacterial-algal cenoses of the Shulgan-Tash cave, Southern Urals // Russ. J. Ecol. 2009. V. 40. № 4. P. 301–303.
10. Abdullin Sh. R. Effect of illumination on the distribution of phototrophic organisms in the entrance part of the Shulgan-Tash cave // Russ. J. Ecol. 2011. V. 42. № 3. P. 249–251.
11. Костиков И. Ю. Альгогруппировки некоторых почв Уссурийского заповедника (Приморский край, Россия) // Альгология. 1994. Т. 4. № 4. С. 40–44.
12. Алексахина Т. И., Штина Э. А. Почвенные водоросли лесных биогеоценозов. М.: Наука. 1984. С. 150.
13. Новичкова-Иванова Л. Н. Почвенные водоросли подзоны широколиственно-хвойных лесов Амуро-Зейского междуречья. В кн.: Амурская тайга. Л.: Наука. 1969. С. 127–153.

The study of the diversity of algae in soils under the vegetation of *Sasa kurilensis* on Iturup Island, Russia using molecular genetic approach

A. Yu. Nikulin¹, V. B. Bagmet¹, V. Yu. Nikulin¹, Sh. R. Abdullin¹

¹*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity of the Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences*

159 100-Letia Vladivostoka Prospect, 690022, Vladivostok, Russia.

**Email: artyrozz@mail.ru*

The first data on biodiversity of algae in soils under vegetation with *Sasa kurilensis* (Rupr.) Makino & Shibata on Iturup Island (Russia) were obtained using classical algological and molecular methods. We found 13 algae species of 10 genera, 10 families, 7 orders, 4 classes and 3 phyla: Bacillariophyta - 3 species, Ochrophyta - 3 species, Chlorophyta - 7 species. All the species recorded are characterized by very extensive or not yet fully established ranges. The low species richness of the studied samples is apparently associated with the strong shading of the habitats under *Sasa kurilensis*.

Keywords: biodiversity, soil algae, polyphasic approach, *Sasa kurilensis*, Iturup Island.

Полногеномное секвенирование экзона образцов ДНК больных раком желудка

© А.Х. Нургалиева^{1*}, Л.Ф. Галлямова¹, Р.Ф. Саттаров¹, Ш.М. Хуснутдинов², Д.Д. Сакаева², Э.К. Хуснутдинова^{1,2,3}

¹Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076, г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

² Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение ФГБ-НУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054, Уфа, проспект Октября, 71.

³Башкирский государственный медицинский университет

Россия, Республика Башкортостан, 450008, г. Уфа, улица Ленина, 3.

*E-mail: alfiyakh83@gmail.com

Проведено полногеномное секвенирование экзона по технологии NGS 5 образцов ДНК опухолевой и прилежащей к ней гистологически нормальной ткани, полученных от пациентов с раком желудка из Республики Башкортостан. Был выявлен патогенный вариант с.1320+1G>A в гене *CDH1* только в опухолевой ткани одного пациента с диффузным типом рака желудка. При этом указанный вариант встречается только среди выборки больных раком желудка и отсутствует в ДНК здоровых доноров..

Ключевые слова: рак желудка, экзом, мутация, секвенирование

Проведено полногеномное секвенирование экзона 5 парных образцов ДНК, выделенных из опухолевой и нормальной ткани больных РЖ. проведен поиск новых генов-кандидатов, ассоциированных с риском развития РЖ, с помощью секвенирования экзона.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК (n=10), выделенных из опухолевой и прилежащей к ней нормальной ткани желудка больных раком желудка (РЖ) с установленным гистологическим типом – аденокарцинома желудка, стадия 3. Возраст пациентов колеблется от 45 лет до 77 лет, средний возраст манифестации заболевания составил 63,4 лет. У каждого пациента с их информированного согласия были взяты образцы периферической крови, нормальной ткани и опухолевой ткани желудка. Учитывая наличие внутриопухолевой гетерогенности, для анализа были отобраны образцы опухолевой ткани из трех районов каждой опухоли и прилежащие к ним образцы нормальной ткани, полученные после хирургической операции. В исследование включены ткани опухолей, содержащие не менее 85% опухолевых клеток.

Ввиду очень большого массива сырых данных для обработки результатов полногеномного секвенирования использовалась уникальная научная установка Центра коллективного пользования научным оборудованием ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» (ЦКП БашГУ) – гетерогенный вычислительный кластер для высокопроизводительных параллельных вычислений.

Анализ данных экзомного секвенирования включал три этапа:

- базовая биоинформатическая обработка (удаление плохих ридов, выравнивание, определение качества секвенирования);
- дополнительная программная обработка (определение кодирующих последовательностей, выравнивание ридов по парам и другое);
- исследовательский анализ (определение типа мутаций, их отбор и выявление функциональной значимости обнаруженных мутаций).

В рамках базовой обработки данных проводили также определение качества секвенирования экзома для каждого образца по программе FastQS High Throughput Sequence QS Report ver.0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

В результате полногеномного секвенирования экзома образцов ДНК, выделенных из опухолевой и прилежащей к ней нормальной ткани желудка больных раком желудка (РЖ) на один образец в среднем выявлено 33205 изменений нуклеотидной последовательности в опухолевой ткани, 33070 – в нормальной ткани. При этом более половины этих изменений были аннотированы, как расположенные в интронных или 3', 5'- нетранслируемых областях.

При анализе функциональной значимости выявленных генетических вариантов в образцах ДНК из нормальной ткани установлено, что 0.54 % являются мутациями, приводящими к образованию или элиминации стоп-кодонов (0.51% - «stopgain», 0.03 % - «stoploss»), 1,13 % - мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания, 49,35 % - синонимичными заменами, 44,97 % - несинонимичными заменами, 1,49 % - инсерциями и делециями, не приводящими к сдвигу рамки считывания. В образцах ДНК из опухолевой ткани большая часть выявленных нарушений также являются несинонимичными (44,75%) и синонимичными (47,67%) заменами; 0,94% - мутациями, приводящими к образованию или элиминации стоп-кодонов (0,90% - «stopgain», 0,04% - «stoploss»), 2,28% - мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания, 1,89 % - инсерциями и делециями, не приводящими к сдвигу рамки считывания.

Следует отметить, что у всех пациентов наибольшее количество генетических вариантов выявлено в генах семейства муцинов – *MUC3A*, *MUC16*. Муцины – гликопротеины высокого молекулярного веса, синтезируемые широким диапазоном эпителиальных тканей. Считается, что муцины играют важную роль в патогенезе злокачественных опухолей различной локализации. *MUC16* является крупнейшим трансмембранным муцином, который играет важную роль в метастазировании, защищая опухолевые клетки от цитотоксических реакций, происходящих при воздействии клеток естественных киллеров. *MUC3A* – основной гликопротеиновый компонент слизи, секретируемой эпителиальными клетками слизистых оболочек, выполняет защитную функцию.

Существуют данные, доказывающие вовлеченность гена *MUC3A* в патогенез рака желудка, показана абберантная экспрессия данного гена в клетках опухоли желудка, выявлена ассоциация с тяжестью течения болезни [1, 2].

После обработки ANNOVAR начинается третий этап обработки – непосредственно исследовательская работа по анализу полученных данных секвенирования экзома. Целью анализа являлся поиск патогенных вариантов, которые могут являться драйверными мутациями при развитии рака желудка. Дальнейший анализ включал в себя использование пользовательского фильтра на основании следующих критериев:

1. Проводился отбор вариантов, расположенных в экзонах и зонах сайтов сплайсинга

2. Отбор потенциально функционально значимых генетических вариантов (в первую очередь рассматриваются транквирующие варианты (мутации сдвига рамки считывания (frame shift) и мутации, приводящие к образованию стоп-кодона) и несинонимические однонуклеотидные замены;

3. Отбор вариантов, частота которых по данным «1000 геномов», ESP6500 и Exome Aggregation Consortium составляет не более 1%. Не описанные ранее варианты, частота которых не известна, на данном этапе не отклонялись, если имели потенциальную функциональную значимость

4. Анализ сигнальных путей, в которые вовлечены гены, отобранные по предыдущим критериям отбора. В первую очередь рассматривались сигнальные пути, вовлеченные в возникновение рака у человека, а именно репарация, апоптоз, контроль клеточного цикла, воспаление и иммунный ответ) и партнеры, с которыми взаимодействует ген-кандидат. Также в список генов вошли кандидаты, для которых были показаны ассоциации с риском возникновения рака желудка по результатам GWAS, гены, в которых были выявлены патогенные варианты при исследованиях экзома у больных РЖ в других странах. Для сбора данной информации использовались базы данных NCBI, COSMIC в которых собрана информация по генам (функция, партнеры и взаимодействия, участие в процессах жизнедеятельности клетки, ассоциация с заболеваниями).

5. Проведена оценка влияния обнаруженных генетических вариантов на функциональное состояние белка и определение роли обнаруженных инсерций/делеций с помощью специализированного программного обеспечения.

В ходе исследовательского анализа результатов полногеномного секвенирования экзома все выявленные генетические изменения, обнаруженные в нормальной и опухолевой ткани, были оценены на функциональную значимость с помощью специализированных программ и общедоступных баз данных. Для новых вариаций были применены биоинформатические подходы, которые позволяют дать направление для дальнейшего поиска.

Общая последовательность определения функциональной значимости неизвестных генетических изменений включала основные шаги: находится ли переменная позиция в кодирующей последовательности, регуляторной области, в области некодирующей РНК и т. д. Если изменение обнаружено в кодирующей последовательности, то является ли она значимой, приводит ли к замене аминокислоты, влияет ли на рамку считывания и т. д.

Обнаруженные изменения в последовательности ДНК были аннотированы с помощью программы ANNOVAR [1], а также проведено сравнение с рядом специализированных баз данных:

dbSNP – база данных, содержащая описание однонуклеотидных полиморфизмов, коротких вставок и делеций, коротких tandemных повторов;

Reference Sequence (RefSeq) – аннотация замен по этой базе данных позволяет понять, как в кодирующую или некодирующую часть генома попала замена. Если в кодирующую, то в какой ген попала замена, в какой экзон этого гена, и привела ли замена к смене аминокислоты или к сдвигу рамки считывания;

Sift – база данных, позволяющая прогнозировать вред синонимичных мутаций для последовательности белка, закодированной геном, содержащим замену;

PolyPhen-2, LTR, MutationTaster annotation, MutationAssessor annotation, FATHMM annotation – базы данных, позволяющая прогнозировать силу вреда замены;

CADD – представляет собой инструмент для оценки вредности единичных нуклеотидных вариантов, а также вариантов вставки / делеции в геноме человека;

ClinVar – база данных, содержащая информацию о клинически значимых полиморфизмах и об их ассоциации с заболеваниями;

1000 Genomes, esp6500, ExAC – базы данных, содержащая информацию о частотах минорных аллелей, составленных на основании результатов секвенирования геномов и экзомов в рамках проектов «1000 genomes» и «NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project».

После анализа функциональной значимости генетических вариантов с использованием всех вышеупомянутых программ при РЖ в отобранных нами генах-кандидатах была выявлена патогенная мутация в гене *CDH1* (с.1320+1G>A). Вариант был подтвержден с помощью секвенирования по Сэнгеру (рис. 1).

Генетический вариант с.1320+1G>A обнаружен в гетерозиготном состоянии в положении +1 донорного сайта сплайсинга экзона 9 гена е-кадгерина *CDH1*, который был подробно описан нами ранее, являющийся одним из основных генов-кандидатов изучаемого заболевания и ассоциированный с наследственным РЖ. Изменение обнаружено в ДНК, выделенной из опухолевой ткани, пациента мужчины, диагноз был установлен в возрасте 67 лет, послеоперационное гистологическое исследование подтвердило наличие низкодифференцированной аденокарциномы, что позволяет классифицировать у пациента диффузный тип РЖ. Помимо этого у больного были обнаружены метастазы карциномы в лимфоузлы малого сальника, прорастание опухоли в серозную оболочку и большой сальник, метастазы аденокарциномы в лимфатические узлы большого сальника, характерные для тяжелого течения болезни.

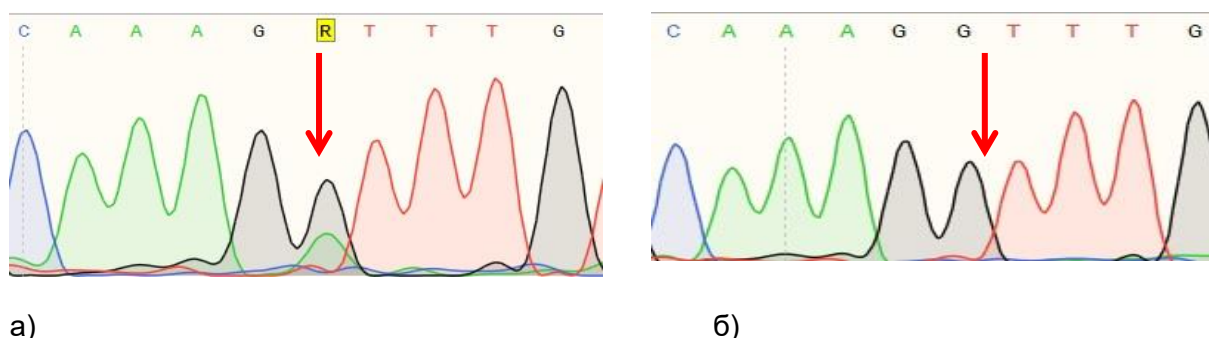


Рисунок 1. Фрагменты нуклеотидной последовательности ДНК с выявленным в результате экзомного секвенирования вариантом с.1320+1G>A в гене *CDH1*: а) образец ДНК с изменением, выделенный из опухолевой ткани больного 8GC; б) образец ДНК без изменения

Изменение с.1320+1G>A не зарегистрировано в базе данных db SNP, однако в базе данных COSMIC есть сведения о том, что этот вариант был обнаружен и классифицирован как соматический минимум у 6 пациентов (4x с диффузным типом РЖ, 1 – с злокачественным образованием аппендикса и 1 – с раком груди) в результате различных полногеномных исследований: Genomic Mutation ID COSV55730311; Legacy Identifier COSM2996774 [3, 4]. Имеются данные о том, что мутация с.1320+1G>A затрагивает канонический консенсусный донорный мотив AGgt границе экзона 9 и интрона 9, который является критическим для сплайсинга. Ghoumid J. С коллегами обнаружили в опи-

сываемой позиции гена *CDH1* замену гуанина на цитозин (с.1320+1G>C, rs886039685) у больных с блефароилодонтическим синдромом [5]. Авторы провели функциональный анализ мутации и выяснили, что она приводит к делеции транскрипта экзона 9, которая приводит к удалению большей части домена EC3 белка *CDH1* (61 аминокислоты от остатка Tyr380 до остатка Lys440), предположительно нарушая его адгезивную функцию. Kievit A. с коллегами у больных с блефароилодонтическим синдромом обнаружили варианты с.1320+1G>A и с.1320+1G>T. Авторы полагают, что данные мутации также приводят к альтернативному сплайсингу и удалению экзона 9 гена *CDH1* [6].

Нами был проведен с помощью секвенирования по Сенгеру поиск обнаруженного в результате секвенирования экзона патогенного варианта у 30 больных с РЖ диффузного типа, а также у 30 здоровых доноров. Ни у одного испытуемого вариант не был выявлен.

Таким образом, обнаруженный в гене *CDH1* соматический вариант также подтверждает роль этого гена в развитии РЖ и необходимости поиска не только герминальных, но и соматических мутаций, как потенциальных маркеров тяжести течения заболевания.

Литература

1. K. Wang, M. Li, H. Hakonarson. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 38(16). – Vol. e164
2. S. Chugh, V.S. Gnanapragassam, M. Jain et al. Pathobiological implications of mucin glycans in cancer: Sweet poison and novel targets // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol. 1856(2). – P. 211-225.
3. M. Kakiuchi, T. Nishizawa, H. Ueda et al. Recurrent Gain-Of-Function Mutations of RHOA in Diffuse-Type Gastric Carcinoma // *Nat Genet.* – 2014. – Vol. 46(6). – P. 583-587.
4. K.W. Wen, J.P. Grenert, N.M. Joseph et al. Genomic profile of appendiceal goblet cell carcinoid is distinct compared to appendiceal neuroendocrine tumor and conventional adenocarcinoma // *Hum Pathol.* – 2018. – Vol. 77. – P. 166-174.
5. J. Ghoumid, M. Stichelbout, A-S. Jourdain et al. Blepharochelodontic syndrome is a *CDH1* pathway-related disorder due to mutations in *CDH1* and *CTNND1* // *Genet Med.* – 2017. – Vol. 19(9). – P. 1013-1021.
6. A. Kievit, F. Tessadori, H. Douben et al. Kievit, A. Variants in members of the cadherin–catenin complex, *CDH1* and *CTNND1*, cause blepharochelodontic syndrome // *Eur J Hum Genet.* – 2018. – Vol. 26(2). – P. 210-219.

Whole genome sequencing of the exome of DNA samples from gastric cancer patients

A. Kh. Nurgalieva¹ *, L.F. Gallyamova¹, R.F. Sattarov¹, Sh.M. Khusnutdinov², D.D. Sakae-va², E.K. Khusnutdinova^{1,2,3}

¹Bashkir State University
Russia, 450076, Republic of Bashkortostan, Ufa, street Zaki Validi, 32.

² Institute of Biochemistry and Genetics is a separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Russia, 450054, Republic of Bashkortostan, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71.

³Bashkir State Medical University
Russia, 450008, Republic of Bashkortostan, Ufa, Lenin street, 3.

* e-mail: alfiyakh83@gmail.com

Genome-wide exome sequencing was performed using NGS technology for 5 DNA samples of tumor and adjacent histologically normal tissue obtained from patients with stomach cancer from the Republic of Bashkortostan. The pathogenic variant c.1320 + 1G> A in the *CDH1* gene was identified only in the tumor tissue of one patient with diffuse gastric cancer. Moreover, this variant is found only among the sample of patients with stomach cancer and is absent in the DNA of healthy donors.

Key words: stomach cancer, exome, mutation, sequencing

Онтогенетические закономерности реализации устойчивости яровой пшеницы при действии абиотического стресса

© Л.В. Осипова¹, И.В. Верниченко², Т.Л. Курносова¹, И.А. Быковская¹, А.А. Лапушкина²

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии
им. Д.Н. Прянишникова
127550, Москва, ул. Прянишникова, 31а

²Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева
127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

E-mail: bykovskaya_irina@bk.ru

В вегетационном опыте оценивалось влияние предпосевная обработка семян (ПОС) биогенным элементом кремнием в онтогенезе яровой пшеницы в условиях стресса, вызванного повышенным содержанием алюминия в почве. Применение ПОС кремнием положительно влияло на продуктивность растений за счет снижения напряженности окислительного стресса и активации синтеза протекторных фотосинтетических пигментов, что, в свою очередь, уменьшало редукцию заложившихся элементов продуктивности.

Ключевые слова: яровая пшеница, кремний, предпосевная обработка семян, продуктивность, алюмоокислотная токсичность, фотосинтетические пигменты

Повышение устойчивости растений к стрессам – актуальная задача сельскохозяйственной науки, направленная на получение высоких и стабильных урожаев. Одним из наиболее распространенных стрессоров является алюминиевая токсичность ограничивающая продуктивность сельскохозяйственных культур. Симптомы алюминиевой токсичности проявляются в условиях кислых почв, занимающих от 40 до 50% площадей пахотных земель в мире. Кислые почвы характеризуются многими неблагоприятными для роста растений свойствами (избыток Mn и H^+ , недостаток фосфора, кальция, магния и молибдена). Токсичность алюминия – ключевой фактор, ограничивающий продуктивность сельскохозяйственных культур.

Проблема алюмоокислотной токсичности решается классическим агрохимическим приемом - известкование почвы. Изучение механизмов токсичности алюминия необходимо для объективной оценки агрохимической перспективности сортов, для выведения новых устойчивых генотипов, усовершенствования теории неспецифической устойчивости растений к стрессам различной природы и разработки способов, оптимизирующих метаболизм при алюмоокислотном стрессе.

По современным представлениям алюмоустойчивость является проявлением общей неспецифической устойчивости растений и связана со способностью растений в ответ на окислительный стресс активизировать систему антиоксидантной защиты [1, 2]. Биогенный элемент кремний является её активным элементом, связывающим алюминий в малотоксичные соединения.

В связи с этим изучали физиолого-биохимические закономерности формирования продуктивности ярово при ПОС кремнием в условиях алюмоокислотного стресса.

Вегетационные эксперименты проводили в почвенной культуре по методике Журбицкого [3] на дерново-подзолистой среднесуглинистой почве со следующей агрохимической характеристикой: $N_{\text{мин.}} = 16$ мг/кг, P_2O_5 93 мг/кг, K_2O 82 мг/кг; $Hg = 4,2$ мг-экв. /100 г почвы; $S = 12,0$ мг-экв. /100 г почвы. Питательные вещества вносили при закладке опытов, создавая фон питания - $N50(PK)100$. В опытные варианты вносили алюминий в дозе 150 мг/кг почвы.

Почву, кроме вариантов с алюминием, известковали по полной норме гидролитической кислотности. В течение вегетации поддерживали оптимальный уровень водообеспеченности – 70%ПВ.

В настоящей работе опыты проводились с яровой пшеницей (*Triticum vulgare* L.) сорта Лиза.

Перед посевом семена обрабатывали раствором силиката натрия (Na_2SiO_3 – 0,15%). Растворы для обработки семян во всех вариантах брали в количестве равном 5% от массы семян.

В проведенных экспериментах определяли физиолого-биохимические показатели: редокс-статус, по интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержание фотосинтетических пигментов в онтогенезе растений.

В результате проведенных исследований установлено, что повышенное содержание алюминия в почве приводило к развитию окислительного стресса, из-за усиления генерации активных форм кислорода (АФК) (рис. 1). Кремний повышает устойчивость к алюминию, участвуя в образовании комплексов с органическими кислотами, снижая, таким образом, его негативное воздействие.

В проведенном эксперименте ПОС кремнием защищала растения пшеницы от окислительного стресса, индуцированного алюминием, о чем свидетельствуют более низкие по сравнению с контролем значения концентрации МДА (рис. 1).

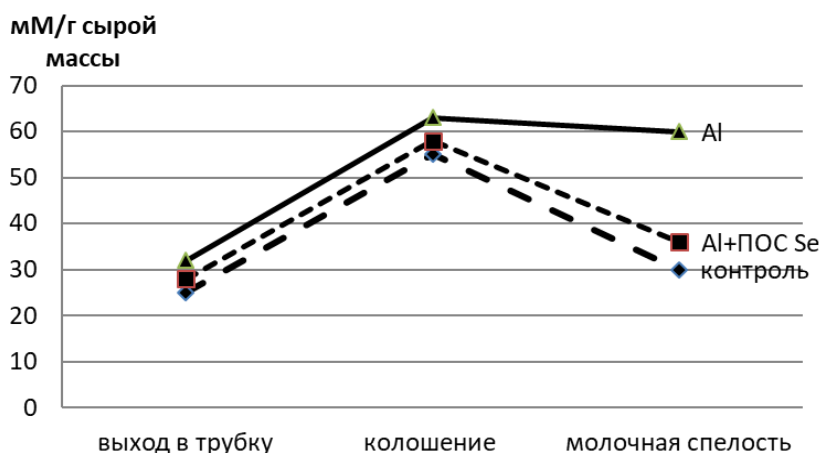


Рис. 1. Содержание МДА в онтогенезе пшеницы, ммоль/г сырой массы

В проведенном эксперименте были отмечены определенные закономерности в содержании фотосинтетических пигментов в онтогенезе яровой пшеницы при действии алюминия в зависимости от ПОС кремнием.

Было установлено, что биосинтез пигментов в верхних листьях яровой пшеницы наиболее интенсивно идет в фазу колошения-цветения (рис. 1а). Это могло быть связано с дополнительной потребностью в ассимилятах. Кроме того, подробный анализ пигментного комплекса показал, что это увеличение обусловлено возрастанием содержания хлорофилла b (рис. 1б). В последние годы было показано, что кроме выполнения основной фотосинтетической функции хлорофилл b является регулятором развития растений и обеспечивает своевременный переход к закладке генеративных структур, цветению, и вызреванию семян [4, 5]. В период цветения отмечено увеличение содержания хлорофилла b более чем в 2 раза, которое снижалось после его окончания. Аналогичным образом изменялось и содержание каротиноидов, которые входят в систему фотозащиты растений (рис. 2в).

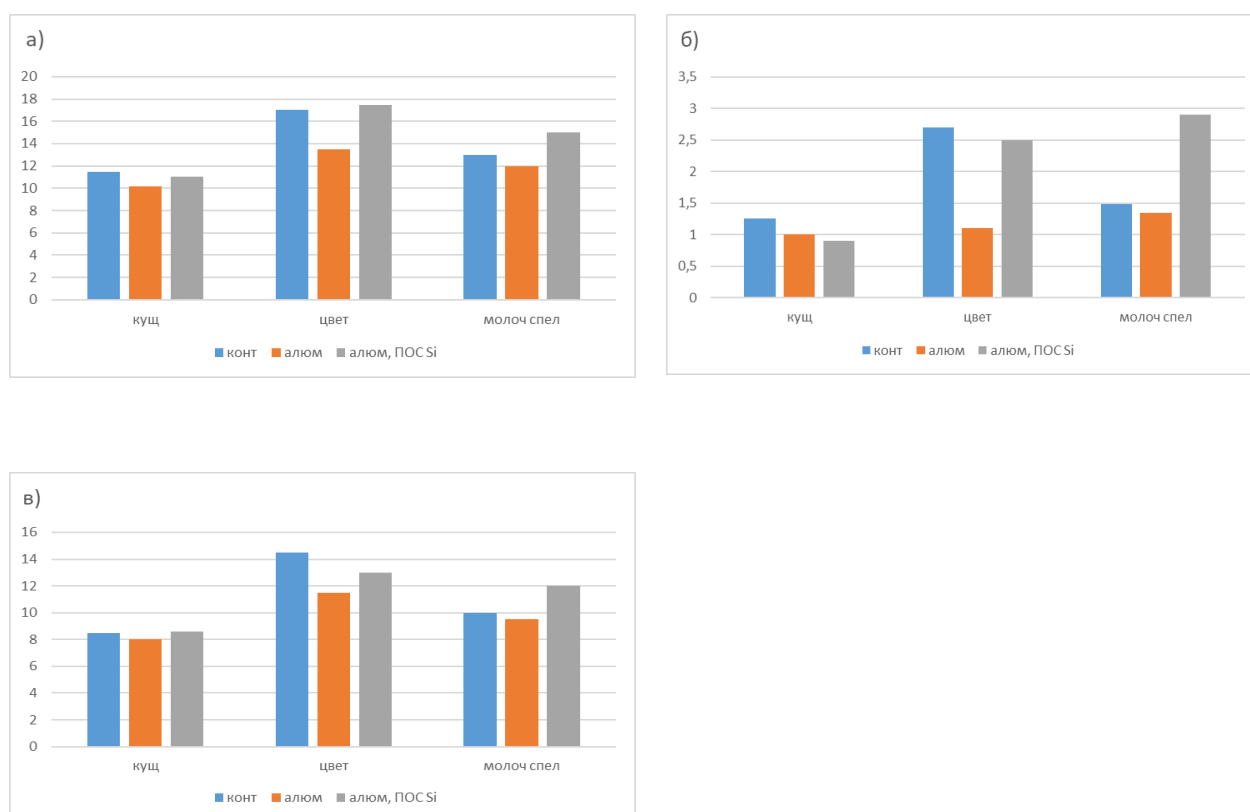


Рис. 2. Содержание пигментов в онтогенезе пшеницы, мг/г сырой массы
а) общее содержание пигментов (хлорофиллы a, b; каротиноиды);
б) содержание хлорофилла b;
в) содержание каротиноидов

Наряду с физиолого-биохимической реакцией растений на стресс отмечено и его влияние на морфогенетические процессы: формирование габитуса, закладку элементов зачаточного колоса, урожай пшеницы и его структуру.

Было установлено, что алюминий оказывал негативное воздействие на продуктивность пшеницы в контрольном варианте, депрессия продуктивности составляла 80%, что было обусловлено уменьшением продуктивного кущения (35%), озерненности колоса (77%) и массы 1000 зерен (9%) (табл. 2).

Таблица 2. Продуктивность и структура продуктивности яровой пшеницы

ПОС	Масса зерна, г/растение		Продуктивная ку- стистость		Число зерен в колосе, шт.		Масса 1000 зе- рен, г	
	контроль	Al	контроль	Al	контроль	Al	контроль	Al
H ₂ O	0,77	0,14	1,8	1,1	19,4	4,4	39,4	35,5
Si	0,82	0,29	1,6	1,2	18,0	6,2	44,4	34,9
HCP _{0,5}	0,05	-				0,26		-

Предпосевная обработка семян кремнием оказала протекторное действие на элементы продуктивности, озерненность колоса и массу зерна с растения, снизилась депрессия кущения.

Защитное действие кремния было связано со снижением сброса заложившихся цветков на конусе нарастания главного побега, что обеспечило большую озерненность колоса и продуктивность всего растения.

Установлено, что повышенное содержание алюминия в почве приводило к развитию окислительного стресса, вызывающего изменения физиолого-биохимического статуса растений в онтогенезе пшеницы и снижение зерновой продуктивности. Применение кремния в виде предпосевной обработки семян активизировало синтез фотосинтетических протекторных пигментов – хлорофилла b и каротиноидов в критический период формирования генеративных органов, снижала напряженность оксидативного стресса, оцениваемого по накоплению малонового диальдегида, уменьшало редукцию заложившихся цветковых зачатков, обеспечивая меньшую депрессию зерновой продуктивности по сравнению с необработанным контролем.

Литература

1. Filiz Vardar F., Unal M. Aluminum toxicity and resistance in higher plants//Advances in Molecular Biology. 2007 – n.1.- P. 1-12.
2. Лисицын Е.М., Амунова О.С. Сравнительная алюмоустойчивость сортов яровой пшеницы, выведенных в Сибири и Европейской части России // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2014. - № 5 (42). – С. 4-9.
3. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. – М.: Наука, 1968. – 266 с.
4. Жученко А.А. Фундаментальные и прикладные научные приоритеты адаптивной интенсификации растениеводства в XXI в. – Саратов: ООО «Новая газета». – 2000. – 275 с.
5. Осипова Л.В., Курносова Т.Л., Быковская И.А. Повышение адаптивного потенциала ячменя ярового (*Hordeum vulgare* L.) при действии абиотического стресса // Проблемы агрохимии и экологии. – 2016. - № 3. – С. 48-51.

Ontogenetic patterns of implementation of spring wheat resistance under action of abiotic stress

L.V. Osipova¹, I.V. Vernichenko², T.L. Kurnosova¹, I.A. Bykovskaja^{1*}, A. A. Lapushkina²

¹ *Pryanishnikov Research Institute of Agricultural Chemistry, Federal Agency Research Organization,
ul. Pryanishnikova 31a, Moscow, 127550, Russia;*

² *Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy
ul. Timiryazevskay, 49, Moscow, 127550, Russia*

*bykovskaya_irina@bk.ru

In the vegetation experiment, the influence of pre-treatment of seeds (PIC) with a biogenic element with silicon in the ontogenesis of spring barley under conditions of stress caused by increased aluminum content in the soil was evaluated. The use of PIC silicon positively affected plant productivity by reducing oxidative stress and activating the synthesis of protective photosynthetic pigments, which, in turn, reduced the reduction of embedded productivity elements.

Keywords: spring wheat, silicon, pre-treatment of seeds, productivity, aluminium acid toxicity, photosynthetic pigments

Комплексы микромицетов при биоремедиации нефтезагрязненной почвы при засолении с применением микробных композиций

© Г.Ф. Рафикова, Е.В. Кузина, Т.Ю. Коршунова

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 69

*Email: rgf07@mail.ru

При внесении углеводородокисляющих бактерий в нефтезагрязненную почву наряду с ускоренной деструкцией нефти отмечено увеличение видового разнообразия комплексов микромицетов. При обработке нефтезагрязненной засоленной почвы микробными композициями формировался более специфичный комплекс микромицетов, основу которого составляли галотолерантные виды, устойчивые одновременно и к умеренным концентрациям нефти в среде.

Ключевые слова: комплексы микромицетов, нефтезагрязненная почва, углеводородокисляющие микроорганизмы.

Нефть и нефтепродукты признаны наиболее опасными загрязнителями окружающей среды. Нефть, попадая в почву, приводит не только к ухудшению ее водного режима и физико-химических свойств, но и к изменению почвенного микробоценоза, тем самым оказывая влияние на процессы трансформации веществ в почве. Для очистки почвы от нефти используют различные приемы, среди которых наиболее перспективным считается биологический метод с использованием микроорганизмов-нефтедеструкторов. Поскольку одновременно с нефтезагрязнением зачастую происходит засоление грунта в результате утечек высокоминерализованных промышленных вод, немаловажным является использование в таких условиях галотолерантных углеводородокисляющих микроорганизмов [1-4]. О глубине происходящих в нефтезагрязненной и рекультивируемой почве микробных перестроек можно судить по показателям численности и видового состава почвенных микроскопических грибов. При этом характер изменений структуры почвенной микобиоты при загрязнении нефтью и биорекультивации может различаться в зависимости от природы применяемого биопрепарата.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния микроорганизмов-нефтедеструкторов (в том числе галотолерантных) на динамику численности и видовой состав микроскопических грибов нефтезагрязненного выщелоченного чернозема.

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента с выщелоченным черноземом ($N_{\text{общ.}} - 0.61\%$, гумус – 10.46%). Для этого воздушно-сухую почву массой 3 кг помещали в вегетационные сосуды и увлажняли до 60% от полной влагоемкости. Для оптимизации водно-воздушного режима почвы использовали дренаж, в течение опыта поддерживали влажность почвы и проводили ее регулярное рыхление. В опытные варианты вносили нефть в концентрации 5 % от веса почвы и 50 мл жидкой. Для обработки почвы использовали штаммы углеводородокисляющих бактерий (УОБ) из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН и ООО «Биохим-Реагент». В опыте использовали отдельные культуры галотолерантных УОБ: *Pseudomonas hunanensis* BCHR-IB-C7 (VKM B-3229D), *Yarrowia lipolytica* BCHR-IB-U2

(ВКПМ У-4382), *Mangrovibacter* sp. ВСНН-ИВ-Л3 (ВКМ В-3230Д); а также композиции УОБ: композиция 1 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753Д), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754Д), *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 (ВКМ В-28361Д), *Y. lipolytica* ВСНН-ИВ-У2; композиция 2 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753Д), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754Д), *Y. lipolytica* ВСНН-ИВ-У2; композиция 3 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753Д), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754Д), *P. hunanensis* ВСНН-ИВ-С7 (ВКМ В-3229Д); композиция 4 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753Д), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754Д), *Mangrovibacter* sp. ВСНН-ИВ-Л3; композиция 5 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753Д), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754Д).

Изучение динамики численности УОБ в почве показало, что все внесенные штаммы микроорганизмов смогли адаптироваться к условиям нефтяного загрязнения и их численность оставалась на относительно высоком уровне в течение всего эксперимента. Наибольшая плотность популяции УОБ наблюдалась в первые 30 суток после постановки эксперимента и в вариантах с внесением микробных композиций составляла в среднем 5×10^7 КОЕ/г, тогда как в контроле была на порядок ниже. Уровень разложения углеводов в почве в целом коррелировал с численностью УОБ. Так, максимальных значений степень деструкции углеводородного субстрата достигала в вариантах с внесением композиций 1, 3, 4, 5 и составляла 32-44% к концу опыта (через 60 суток) против 11.7% в контроле.

Загрязнение выщелоченного чернозема нефтью стимулировало развитие грибов (табл.), что, вероятно, связано с тем, что углеводороды нефти в умеренной концентрации (5%) не оказывают столь выраженного токсического эффекта и используются данной группой микроорганизмов в качестве субстрата. Использование УОБ для биоремедиации способствовало незначительному уменьшению этого показателя по сравнению с контролем, очевидно, за счет ускоренного разложения углеводов нефти в почве и быстрого исчерпания источника углерода и энергии, доступного для микромицетов. Через 60 суток после постановки эксперимента в некоторых опытных вариантах наблюдалось незначительное увеличение доли грибов, возможно за счет использования ими в качестве субстрата погибших клеток УОБ. В целом, в течение эксперимента в вариантах с внесением УОБ не было отмечено резкого колебания численности микроскопических грибов.

Из исследованных образцов выщелоченного чернозема было выделено 16 видов микромицетов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Microdochium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*. В выщелоченном черноземе преобладали грибы из родов *Aspergillus* и *Penicillium*. В незагрязненной почве и опытных вариантах доминировал, главным образом, вид *Penicillium glabrum*. Внесение нефти в выщелоченный чернозем приводило к появлению таких видов как *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium lanosum* и *Talaromyces variabilis*, не присутствовавших ранее в незагрязненной фоновой почве. Загрязнение почвы нефтью обуславливало изменение структуры комплекса микромицетов за счет перехода большинства типичных видов в ранг случайных. Аналогичные тенденции были отмечены и другими исследователями при изучении воздействия загрязнения выбросами предприятий цветной металлургии на комплексы почвенных микромицетов [5, 6]. При обработке почвы жидкой культурой микроорганизмов-нефтедеструкторов в целом наблюдалось увеличение видового разнообразия грибов при сохранении типичных видов, характерных для фоновой почвы.

Таблица. Динамика численности микромицетов в выщелоченном черноземе при загрязнении нефтью и внесении микроорганизмов-нефтедеструкторов, 10⁵ КОЕ/г

Варианты	Сроки отбора образцов	
	30 суток	60 суток
Контроль	1.5±0.06	1.2±0.06
НФ (нефтезагрязненная почва)	5.0±0.21	2.5±0.10
НФ + NaCl + <i>Yarrowia lipolytica</i> BCHR-IB-U2	0.7±0.03	0.3±0.01
НФ + <i>Yarrowia lipolytica</i> BCHR-IB-U2	2.1±0.10	2.0±0.1
НФ + NaCl + <i>Pseudomonas hunanensis</i> BCHR-IB-C7	2.2±0.11	0.6±0.04
НФ + <i>Pseudomonas hunanensis</i> BCHR-IB-C7	2.0±0.11	2.5±0.12
НФ + NaCl + <i>Mangrovibacter</i> sp. BCHR-IB-L3	0.3±0.01	0.4±0.02
НФ + <i>Mangrovibacter</i> sp. BCHR-IB-L3	0.6±0.02	1.6±0.07
НФ + Композиция 1	2.0±0.10	2.5±0.12
НФ + Композиция 2	2.5±0.11	1.5±0.07
НФ + Композиция 3	3.0±0.13	2.8±0.12
НФ + Композиция 4	4.2±0.18	3.2±0.15
НФ + Композиция 5	4.0±0.18	1.0±0.05

Совместное воздействие нефти и засоления значительно изменяло видовой состав микромицетов и приводило к формированию более специфичного комплекса. В загрязненных почвенных образцах, обработанных культурами галотолерантных УОБ, и с дополнительным внесением NaCl элиминировался вид *Penicillium glabrum*, очевидно, в силу его чувствительности к повышенной концентрации соли. При этом доминирующее положение занимали другие виды, вероятно, более толерантные к засолению - *Penicillium expansum*, *P. decumbens*, *P. velutinum*, что согласуется с данными других исследователей, выделявших некоторые из этих видов из мест природного засоления [7, 8]. В целом, в данных вариантах эксперимента отмечалась тенденция снижения числа видов и изменения видового разнообразия почвенных микромицетов.

В результате кластерного анализа, проведенного по показателю видового сходства, было получено распределение микромицетов по двум группам в нефтезагрязненной почве при внесении УОБ в качестве рекультивирующего агента (рис.). Первую группу составили, главным образом, все варианты эксперимента с внесением NaCl. Это позволяет говорить о том, что наибольшее влияние на почвенную микобиоту оказывало засоление на фоне нефтяного загрязнения. При этом внесение галотолерантных штаммов УОБ не смогло привести к восстановлению исходного состава почвенной микобиоты. Во вторую группу вошли опытные варианты более сходные с контролем по

видовому составу микромицетов. Внесение в нефтезагрязненную почву тех же штаммов бактерий-нефтедеструкторов, что и в засоленные почвенные образцы, приводило к формированию микобиоты более сходной с таковой контрольного варианта. Максимальное сходство с микобиотой контроля обнаруживалось в вариантах с применением Композиции 3 и Композиции 1 – они составляли отдельный кластер с незагрязненной почвой.

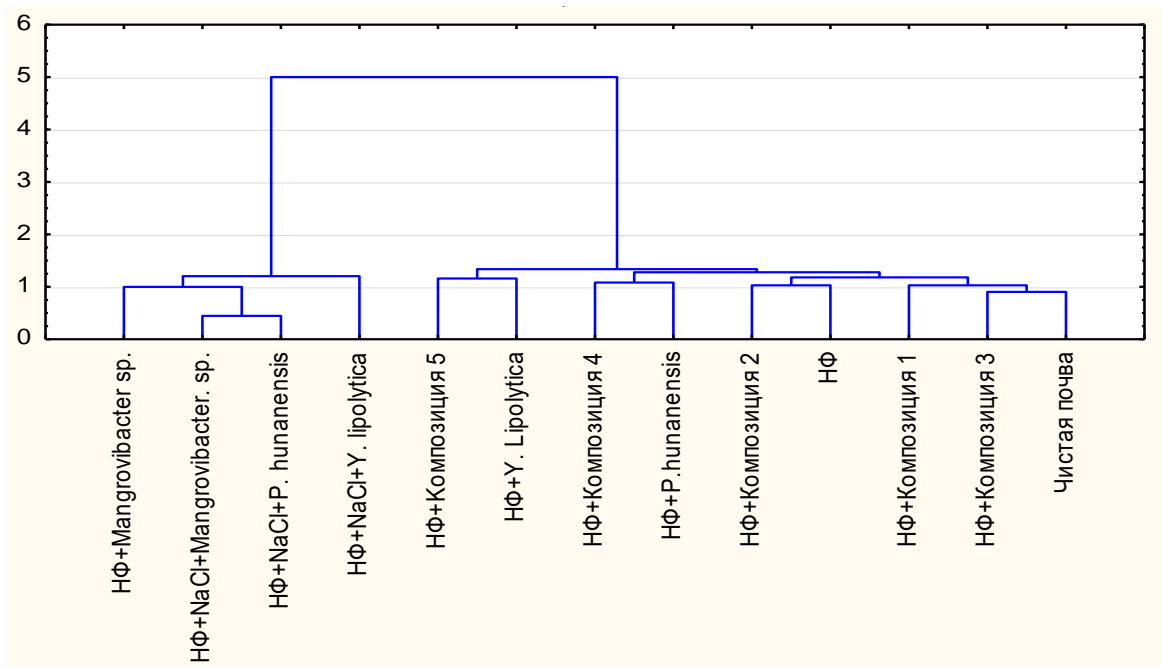


Рис. Сходство видового состава комплексов микромицетов различных вариантов эксперимента с контролем: НФ – нефтезагрязненная почва. По оси абсцисс – варианты эксперимента. Евклидово расстояние, метод Варда.

Таким образом, нефтяное загрязнение совместно с засолением оказывало большее влияние на видовой состав грибов выщелоченного чернозема, чем внесение в почву только нефти. В обработанных УОБ вариантах с засолением на фоне загрязнения формировался более специфичный комплекс микромицетов, основу которого составляли галотолерантные виды, устойчивые одновременно и к умеренным концентрациям нефти в среде. Применение углеводородокисляющих штаммов микроорганизмов для рекультивации почвы, подверженной воздействию нефти, изменяло структуру почвенной микобиоты при незначительном влиянии на численность грибов. Внесение УОБ в нефтезагрязненную почву приводило к увеличению видового разнообразия комплексов микромицетов при сохранении типичных видов, характерных для фоновой почвы; ускоренному разложению углеводов нефти. Применение Композиции 1 и Композиции 3 для рекультивации нефтезагрязненного выщелоченного чернозема наряду с перечисленными положительными эффектами способствовало формированию комплексов микромицетов сходных с фоновыми. Композиция 1, состоящая из микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1, *Y. lipolytica* ВСНН-ИВ-У2, и Композиция 3, в состав которой входят штаммы бактерий *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, *P. hunanensis* ВСНН-ИВ-С7, могут быть успешно использованы в качестве основы биопрепарата-нефтедеструктора.

Работа выполнена в рамках ГЗ УФИЦ РАН (№ 075-00326-19-00) по теме № АААА-А18-118022190100-9 на базе УИБ УФИЦ РАН и при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05025/18 с использованием оборудования ЦКП «Агидель» (Уфа, Россия).

Литература

1. Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, western Siberia, and Vietnam // *Microbiology*. 2006. Vol. 75, N 1. P. 66-72.
2. Плотникова Е.Г., Ястребова О.В., Ананьина Л.Н., Дорофеева Л.В., Лысанская В.Я., Демаков В.А. Галотолерантные бактерии рода *Arthrobacter* - деструкторы полициклических ароматических углеводородов // *Экология*. 2011. № 6. С. 459-466.
3. Kumar M., Leon V., De Sisto Materano A., Ilzins O.A., Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008. V. 24. P. 1047-1057.
4. Varjania S.J., Rana D.P., Jain A.K., Bateja S., Upsani V.N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2015. V. 103. P. 116-124.
5. Евдокимова Г.А., Корнейкова М.В., Лебедева Е.В) Сообщества микромицетов в почвах в зоне воздействия алюминиевого завода // *Микология и фитопатология*. 2007. Т. 41, вып.1. С. 20–28.
6. Евдокимова Г.А., Корнейкова М.В., Мозгова Н.П. Изменения свойств почв и почвенной биоты в зоне воздействия аэротехногенных выбросов Кандалакшского алюминиевого завода // *Почвоведение*. 2013. № 10. С. 1274-1280.
7. Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitas A. Halotolerant and halophilic fungi // *Biodiversity of fungi: their role in human life*. New Delhi: India. Oxford et IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 2005. P. 69-127.
8. Смолянук Е.В., Биланенко Е.Н. (Smolyanuk, Bilanenko) Сообщества галотолерантных микромицетов из мест природного засоления // *Микология и Фитопатология*. 2011. Т. 45, вып. 5. С. 418-426.

Complexes of micromycetes in bioremediation of oil contaminated soil during salinization using microbial compositions

G.F. Rafikova, E.V. Kuzina, T.Y. Korshunova

*Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences
69 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

Email: rgf07@mail.ru

When introducing hydrocarbon-oxidizing bacteria into oil-polluted soil, along with accelerated destruction of oil, an increase in the species diversity of micromycete complexes was observed. When treating oil-contaminated saline soil with microbial compositions, a more specific complex of micromycetes was formed, which was based on halotolerant species that were resistant to moderate concentrations of oil in the medium at the same time.

Keywords: complexes of micromycetes, oil-contaminated soil, hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

Подход к повышению эффективности производственного процесса с использованием объемных композитных структур

© В. И. Румянцева, В. В. Виноградов

Национальный исследовательский университет ИТМО
Россия, 197101 г. Санкт-Петербург, проспект Кронверкский, 49.

Email: valeriya_rumyantceva@scamt-itmo.ru

В качестве подхода к повышению эффективности производственного процесса предложена объемная печать композитных структур, содержащих энтрапированные клетки микроорганизмов, с контролируемыми свойствами сборки и функцией многократного разложения пищевых отходов.

Ключевые слова: ферментные системы, наноструктурированные композиты, объемные структуры, контролируемые параметры, пищевая биотехнология, ресурсосбережение.

В настоящее время все большую актуальность приобретает проблема неэффективного способа утилизации пищевых отходов, содержащих питательные компоненты. Так, например, при многотоннажном изготовлении хлеба и хлебных продуктов в переработку уходит не более 10 % неиспользованной продукции [8]. При этом большинство из них являются пригодными для разложения и получения нового вида производственного сырья, но нуждаются в прохождении специальных процессов подготовки и обработки. Вариант внедрения ферментативной конструкции многократного использования представлен на рисунке 1.

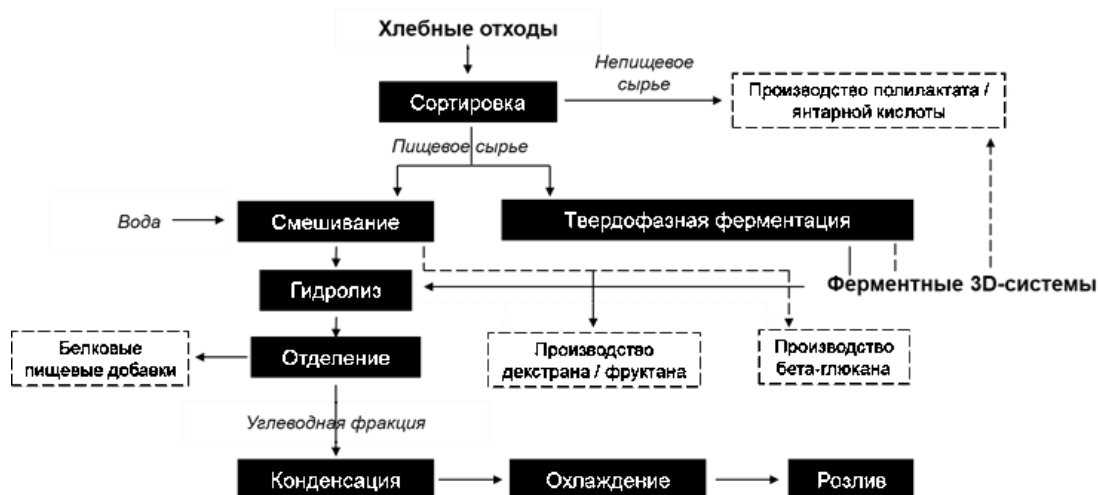


Рис. 1. Схема переработки вторичного хлебного сырья с помощью ферментных 3D систем.

В изготовлении многих функциональных продуктов используются процессы ферментации. Это позволяет получать продукт с минимальным количеством синтетических соединений, применяемых в производственном цикле и различных процессах очистки конечного субстрата. Однако непрерывный процесс обновления ферментативного субстрата с его последующей иммобилизацией приводит к тому, что технология становится экономически нецелесообразной для массовой доступности товара.

На сегодняшний день существует несколько разработок для повышения эффективности использования ферментативного процесса на производстве. Так, например, используется реактивация агрегированных белков или необратимо денатурированных ферментов [1], десорбция фермента со стенок реакционного сосуда [2]. Однако они не способны удовлетворить всем требованиям доступности, эффективности и безопасности. Кроме того, для выделения ферментативных комплексов из их источника необходимо использовать ряд специально подобранных технологий, в том числе по обработке и подготовке к использованию, иммобилизации и т.п. [5]. Одним из вариантов является химическое осаждение для прикрепленных к бактериальной клетке катализирующих соединений. Данный метод позволяет выделить одновременно целый комплекс ферментов, например, целлюлозосому из бактерий рода *Clostridium* [5]. Для использования таких комплексов в пищевом производстве необходимо соблюдать требования по безопасности их использования: фильтрацию, холодную стерилизацию и т.п.

В то же время, в современном мире большую популярность по решению многих производственных проблем приобретают аддитивные технологии [12-13,15]. Предполагается, что создание «живых» ферментных каркасных структур, ориентированных на повышение эффективности и, в то же время, экологичность производства, позволит преодолеть трудности, связанные с нестабильностью фермента, продолжительностью его действия и многократностью использования. Возможность управления процессом ферментации позволит получать целевой продукт с заданной совокупностью свойств. Направленное действие системы обеспечивает оптимальные условия ее применения [10-11]. Экструзионная объемная печать способна решить ряд проблем, связанных с дозированием отдельных структур общей системы и направлением их сборки. Также установлено, что данные методы сборки способствуют стабильному послойному формированию структур [3].

Исследованиями установлено, что важную роль в объемной печати играет полимерный материал, из которого изготавливаются конструкции. Соотношение компонентов и природа полимера сказывается на эффективности работы всей системы. При этом большую популярность приобретают естественные полимерные соединения, такие как фибриллярный белок [4,6], целлюлоза и наноцеллюлоза [9], желатин [4], пектин [14].

В данной работе исследован потенциал использования аддитивной технологии формирования многокомпонентных 3D-структур с энтрапированием модельного организма – дрожжей.

В качестве перспективной технологии была использована печать с отверждением ближним ультрафиолетовым излучением, посредством которого возможно получить продукт с низкой степенью контаминации и высокой степенью выживаемости целевых клеток дрожжей [9].

Был осуществлен синтез матрицы для биочернил: золь наноцеллюлозы двух видов (N-CNC и S-CNC), связующий (диметакрилат полиэтиленгликоля) и сшивающий (фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития) компоненты и культура микроорганизмов в виде дрожжевого субстрата. Структуры были напечатаны в виде кубовидной решетки, в качестве контроля использовали плотную структуру с формой висячей капли.

На основании литературных данных и анализа вязкости компонентов биочернил было подобрано их наиболее оптимальное соотношение 90:10:9 в пользу содержания наноцеллюлозы [7,8]. Содержание дрожжевых клеток определялось соотношением по массе 10:1 относительно наноцеллюлозы.

Основная целесообразность использования системы определялась на основании эффективного получения конечного продукта. Во избежание контаминации рабочей среды содержание этанола в растворе определяли в процентах по массе. Массу рабочей системы определяли в несколько этапов (табл. 1).

Таблица 1. Определение массы рабочей системы

Образец	Этапы измерения массы, г					
	Масса с дрожжами	Первый этап (48 ч)	Второй этап (48 ч)		Третий этап (48 ч)	
			исходное	с заменой среды	исходное	с заменой среды
Контроль	5,019±0,005	4,969±0,007	4,958±0,004	-	4,947±0,002	-
N-CNC куб1	5,517±0,009	5,479±0,008	-	5,471±0,007	-	5,476±0,007
N-CNC куб2	5,518±0,003	5,472±0,009	5,463±0,009	-	5,459±0,009	-
N-CNC шар1	5,513±0,007	5,490±0,006	-	5,493±0,004	-	5,499±0,004
N-CNC шар2	5,518±0,007	5,493±0,009	5,487±0,007	-	5,481±0,007	-

Результаты продемонстрировали необходимость замены среды каждые 48 ч для обновления питательных компонентов в системе и способствования постадийной пролиферации дрожжевых клеток. Динамику выделения спирта из глюкозосодержащей среды определяли во временном интервале от 48 до 240 ч (рис. 2).

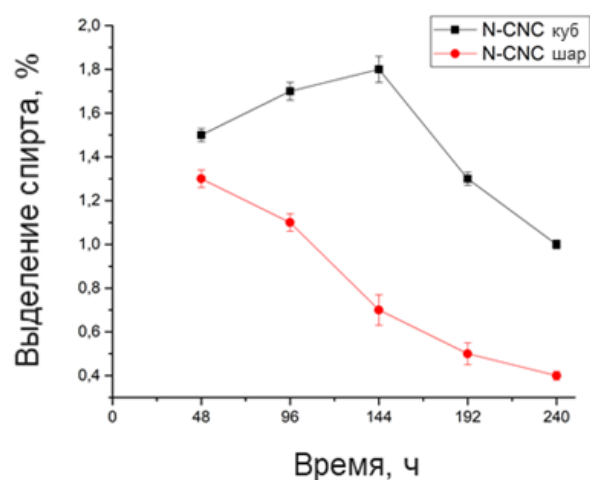


Рис. 2. Динамика выделения этилового спирта из глюкозосодержащего субстрата.

На основании калибровочной кривой этанола и с учетом перерасчета на массу рабочего раствора вычислили, что разработанные структуры способны перерабатывать глюкозосодержащую среду до этилового спирта в количестве около 1,5 % в среднем в течение пяти этапов использования. Для шарообразных структур данный показатель ниже, и при этом он не сохраняется на дальнейших этапах использования. С течением времени до 144 часов система претерпевает незначительные изменения, в том числе связанные со стабильностью структурно-механических свойств объемной структуры, однако переработка оставшегося субстрата продолжает осуществляться.

Работа выполнена при в рамках НИР №390434 «Синтез и применение наноструктурированных чернил для 3D печати материалов широкого спектра применения».

Литература

1. Brown I. et al. Kinetic study of the thermal denaturation of a hyperthermostable extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2013. – Т. 1834. – №. 12. – С. 2600-2605. - 1
2. De Lathouder K. M. et al. Structured reactors for enzyme immobilization: a monolithic stirrer reactor for application in organic media // *Chemical Engineering Research and Design*. – 2006. – Т. 84. – №. 5. – С. 390-398. - 2
3. González-Henríquez C. M., Sarabia-Vallejos M. A., Rodríguez Hernandez J. Antimicrobial polymers for additive manufacturing // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Т. 20. – №. 5. – С. 1210. - 3
4. Huang L. et al. Bacterial cellulose nanofibers promote stress and fidelity of 3D-printed silk based hydrogel scaffold with hierarchical pores // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Т. 221. – № December 2018. – С. 146–156.
5. Hyeon J. E., Shin S. K., Han S. O. Design of nanoscale enzyme complexes based on various scaffolding materials for biomass conversion and immobilization // *Biotechnology Journal*. – 2016. – Т. 11. – № 11. – С. 1386–1396. - 4
6. Kiseleva A.P. et. al. Optically active hybrid materials based on natural spider silk // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2019. – Т. 11. – № 26. – С. 22962-22972.

7. McCarthy R. R. et al. The use of bacterial polysaccharides in bioprinting // *Biotechnology advances*. – 2019. – T. 37. – № 8. – C. 107448. - 6
8. Melikoglu M., Webb C. Use of Waste Bread to Produce Fermentation Products: Mehmet Melikoglu, Colin Webb // *Food Industry Wastes*. – 2013. – C. 63-76. - 7
9. Qian F. et al. Direct Writing of Tunable Living Inks for Bioprocess Intensification // *Nano Letters*. – 2019. – T. 19. – № 9. – C. 5829-5835. - 8
10. Rummyantceva V. I. et al. Biocide-conjugated magnetite nanoparticles as an advanced platform for biofilm treatment//*Therapeutic Delivery, IET*. – 2019. – T. 10. – № 4. – C. 241-250. - 9
11. Rummyantceva V. I. et. al. Magnetically controlled carbonate nanocomposite with ciprofloxacin for biofilms eradication // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – C. 6187. - 10
12. Schaffner M. et al. 3D printing of bacteria into functional complex materials // *Science Advances*. – 2017. – T. 3. – № 12. – C. eaao6804. - 11
13. Shavandi A., Jalalvandi E. Biofabrication of bacterial constructs: New three-dimensional biomaterials // *Bioengineering*. – 2019. – T. 6. – № 2. – C. 1-6. – 12
14. Vancauwenberghe V. et al. 3D printing of plant tissue for innovative food manufacturing: Encapsulation of alive plant cells into pectin based bio-ink // *Journal of Food Engineering*. – 2019. – T. 263. – C. 454–464
15. Xiang H. et al. UV-curable, 3D printable and biocompatible silicone elastomers // *Progress in Organic Coatings*. – 2019. – T. 137. – C. 105372. – 13

An approach to improving the efficiency of the production process using volumetric composite structures

V. I. Rummyantceva, V. V. Vinogradov

ITMO University

49-A Kronverkskiy prospect, 197101 Saint-Petersburg, Russia.

Email: valeriya_rummyantceva@scamt-itmo.ru

As an approach to improving the efficiency of the production process, the volume printing of composite structures containing entrapped cells of microorganisms with controlled assembly properties and the function of multiple decomposition of food waste is proposed.

Keywords: enzyme systems, nanostructured composites, bulk structures, controlled parameters, food biotechnology, resource conservation.

Актуальная стратегия эрадикации сформированных биопленок при использовании магнитных наноструктур

© В. И. Румянцева, Е. И. Кошель

*Национальный исследовательский университет ИТМО
Россия, 197101 г. Санкт-Петербург, проспект Кронверкский, 49.*

Email: viktoriya_rumyantceva@scamt-itmo.ru

В качестве наиболее эффективной стратегии борьбы с биопленками предложен магнитоуправляемый керамический нанокompозит с контролируемыми параметрами релиза активного компонента под воздействием высокочастотного магнитного поля.

Ключевые слова: биопленки, наноструктурные композиты, антибактериальные свойства, контролируемые параметры, биоциды.

Образование биопленок на биотических и абиотических поверхностях является критической проблемой в самых разных областях, от сельского хозяйства и промышленности до медицины. Поскольку биопленки оптимизируют выживание большинства микроорганизмов, колонизации могут подвергаться любые поверхности, включая человеческое тело и медицинские устройства. Инфекция имплантатов абиотических устройств, находящихся в прямом контакте с пациентом, является одним из серьезных и частых медицинских осложнений [1-3]. Ткани и органы человека также подвержены колонизации микроорганизмами, что провоцирует воспаление при таких заболеваниях, как муковисцидоз, отит и перикардит [4].

Терапия воспаления, связанного с биопленкой, представляет собой серьезную проблему, поскольку бактерии внутри биопленки в 100–1000 раз более устойчивы к обычным антибактериальным агентам, эффективным против свободно плавающих (планктонных) бактериальных клеток. Низкая эффективность биоцидов против биопленок определяется их механическими и химическими свойствами, что препятствует глубокому проникновению антибиотика. Еще одна важная проблема - клетки с пониженным метаболизмом, известные как «персистеры» [5]. Следовательно, для эффективной антибактериальной терапии биопленки следует предварительно дезинтегрировать. Однако агрессивные антибактериальные составы и грубое механическое действие недопустимы для использования внутри организма [6-8]. Практического и нетравматичного подхода к решению этой проблемы пока нет. Наиболее эффективные стратегии борьбы с биопленками по-прежнему основаны на травматичных и дорогостоящих процедурах удаления биопленок или замены пораженных поверхностей [4,8-11]. С увеличением числа имплант-зависимых операций и осложнений, вызванных образованием и развитием биопленки, необходимость в разработке эффективной терапии постоянно возрастает. Описанные выше проблемы можно решить с помощью механического разрушения биопленки с последующим интенсивным высвобождением биоцидных компонентов.

Биоцид-конъюгированные наночастицы и наноструктурные композиты, энтрапированные активными веществами являются отличной возможностью для неинвазивной терапии, поскольку благодаря небольшому размеру и уникальным физико-химическим

свойствам такие системы могут проявлять ценные свойства в биомедицинской практике [12-15].

В настоящей работе рассмотрены механизмы влияния нанокompозитов на основе наночастиц магнетита на бактериальные клетки и их консорциумы: механическая дезинтеграция, синергетическое антибактериальное воздействие компонентов композита и др., а также разница во влиянии на биопленку составляющих потенциального композита в отдельности (рис. 1).

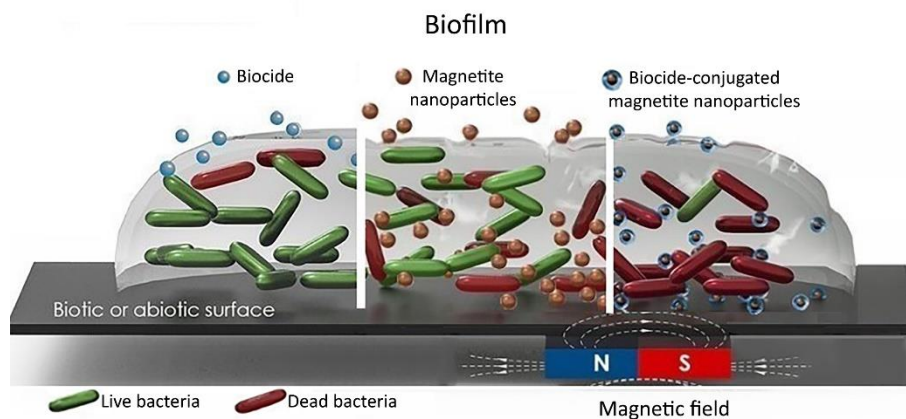


Рис. 1. Разница во влиянии антибиотика, магнитных наночастиц и композита на деградацию биопленки.

В результате проведенного сравнительного анализа подобраны материалы для разработки новых высокоэффективных композитов. Среди них наиболее перспективными выделены магнитные биосовместимые наночастицы для придания композиту уникальных свойств, карбонат кальция и его производные в виде керамического каркаса. Оптимальный протокол получения нанокompозита состоит из синтеза наночастиц магнетита методом соосаждения с помощью ультразвука [16] и синтеза микрочастиц на их основе методом соконденсации при добавлении насыщенных растворов хлорида кальция, карбоната натрия и биоактивного соединения [17].

В ходе изучения свойств полученного наноструктурированного композита отмечены механизмы медленного, самопроизвольного, и быстрого, инициируемого, релиза активного компонента через матричный каркас (рис. 2). Отмечены преимущества работы магнитной системы, позволяющей производить локализацию биоцидных компонентов в очаге инфицирования.

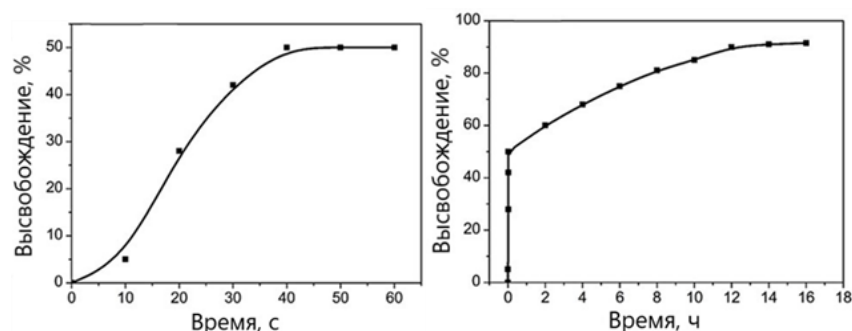


Рис. 2. Кривые высвобождения биоцидного компонента магнитного керамического композита: 1 – пассивный релиз; 2 – инициируемое высвобождение.

Эффективность антибактериального действия разработанного нанокompозита против сформированных биопленок определялась на модельных штаммах микроорганизмов: грамположительных *S. aureus* и грамотрицательных *E. coli*. В качестве биоцида был использован антибиотик ципрофлоксацин (ЦФ), обладающий широким спектром действия против различных видов бактерий. Биомассу биопленки и количество живых клеток в ней исследовали через 24 ч инкубации с исследуемыми образцами (табл. 1). Количество биомассы анализировали по количеству связывающего красителя, кристаллического фиолетового, оставшегося после промывки биопленок. Чем выше эффективность композита или антибиотика, тем меньшее количество красителя связывается с биопленкой, что определяет количественную характеристику последней.

Таблица 1. Эффективность нанокompозита против образованных биопленок *E. coli* и *S. aureus*

Состав образца	Масса биопленки после обработки (M ± SD)		Эффективность ЦФ в составе нанокompозита по сравнению со свободной формой ЦФ, %
	ЦФ ¹ в свободной форме	ЦФ в составе нанокompозита	
<i>E. coli</i>			
-	0,951±0,07		-
нанокompозит	0,516±0,05		-
нанокompозит с 0,15 мкг/мл ЦФ	0,443±0,02	0,275±0,02	38
<i>S. aureus</i>			
-	1,575±0,08		-
нанокompозит	0,370±0,02		-
нанокompозит с 2,5 мкг/мл ЦФ	0,853±0,06	0,239±0,01	72

Как и ожидалось, антибиотик, иммобилизованный в нанокompозите, показал более высокую эффективность против образовавшихся биопленок, чем антибиотик в его исходной форме. На основании полученных данных можно судить о синергетическом дей-

ствии нанокompозита и ципрофлоксацина, в первую очередь, для грамположительных видов бактерий – эффективность по отношению к *S. aureus* составила 72%.

Таким образом, были доказаны преимущества применения нанокompозитных материалов для комплексной борьбы с биопленочными образованиями, в частности на абиотических поверхностях, что является перспективным заделом для дальнейших исследований в данной области, в том числе проводимых на антибиотикорезистентных штаммах микроорганизмов и с применением других биоцидных компонентов, а также проводимых *in vivo* для всесторонней оценки возможности применения разработанного комплекса в фармакологической и медицинской практике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-00125.

Литература

1. Arciola C. R., Campoccia D., Ehrlich G. D. Biofilm-based implant infections in orthopaedics // Biofilm-based healthcare-associated infections. 2015. Pp. 29-46.
2. Arciola C. R., Campoccia D., Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion // Nature Reviews Microbiology. 2018. Vol. 16. Pp. 397-409.
3. Montanaro L., Speziale P., Campoccia D. Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics // Future Microbiology. 2011. Vol. 6. Pp. 1329-1349.
4. Bouza E., Garcia-Garrote F., Cercenado E. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain // Antimicrobial Agents and chemotherapy. 1999. Vol. 43. Pp. 981.
5. Prax M., Bertram R. Metabolic aspects of bacterial persisters // Frontiers in cellular and infection microbiology. 2014. Vol. 4. Pp. 148.
6. Römling U., Kjelleberg S., Normark S. Microbial biofilm formation: a need to act // Journal of internal medicine. 2014. Vol. 276. Pp. 98-110.
7. Ribet D., Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues // Microbes and infection. 2015. Vol. 17. Pp. 173-183.
8. Percival S. L., Suleman L., Vuotto C. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control // Journal of medical microbiology. 2015. Vol. 64. Pp. 323-334.
9. Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014 // Clinical microbiology and infection. 2015. Vol. 21. Pp. S1-S25.
10. Mermel L. A., Allon M., Bouza E. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America // Clin Infect Dis. 2009. Vol. 49. Pp. 1-45.
11. Lebeaux D., Ghigo J. M., Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics // Microbiology and molecular biology reviews: MMBR. 2014. Vol. 78. Pp. 510.

12. Chifiriuc M. C., Grumezescu A. M., Andronescu E. Water dispersible magnetite nanoparticles influence the efficacy of antibiotics against planktonic and biofilm embedded *Enterococcus faecalis* cells // *Anaerobe*. 2013. Vol. 22. Pp. 14-19.
13. Niemirowicz K., Durnas B., Tokajuk G. Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016. Vol. 12. Pp. 2395-2404.
14. Cotar A. I., Grumezescu A. M., Andronescu E. Nanotechnological solution for improving the antibiotic efficiency against biofilms developed by gram-negative bacterial strains // *Lett. Appl. NanoBioSci*. 2013. Vol. 2. Pp. 97-104.
15. Rumyantceva V. I., Rumyantceva V. I., Koshel E. I. Biocide-conjugated magnetite nanoparticles as an advanced platform for biofilm treatment // *Therapeutic delivery*. 2019. Vol. 10. Pp. 241-250.
16. Shapovalova O. E., Drozdov A. S., Brushkova E. A. Room-temperature fabrication of magnetite-boehmite sol-gel composites for heavy metal ions removal // *Arab. J. Chem*. 2020. Vol. 13. Pp. 1933-1944.
17. Rumyantceva V. I., Rumyantceva V. I., Andreeva Y. I. Magnetically Controlled Carbonate Nanocomposite with Ciprofloxacin for Biofilm Eradication // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Pp. 6187.

Actual strategy for formed biofilms eradication using magnetic nanostructures

V. I. Rumyantceva, E. I. Koshel

ITMO University

49-A Kronverkskiy prospekt, 197101 St. Petersburg, Russia.

Email: viktoriya_rumyantceva@scamt-itmo.ru

A magnetically controlled ceramic nanocomposite with controlled release parameters of the active component under the influence of a high-frequency magnetic field has been proposed as the most effective strategy for combating biofilms.

Keywords: biofilms, nanostructured composites, antibacterial properties, controlled parameters, biocides.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, с развитием бронхиальной астмы у детей

© О.Н. Савельева¹, А.С. Карунас^{1,3}, Ю.Ю. Федорова², Э.И. Эткина³, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, улица Проспект Октября, 71.

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, улица Ленина, 3.

E-mail: olyasavelie@yandex.ru; carunas@list.ru

Гистамин – это важнейший биогенный амин, участвующий в регуляции деятельности клеток и систем, является одним из основных медиаторов аллергических реакций немедленного типа. Целью данной работы было исследование полиморфных вариантов генов секретогранина 3 *SCG3* (rs17525472) и полипептида 1, активирующего аденилатциклазу *ADCYAP1* (rs2231187), участвующих в метаболизме гистамина, у детей из Республики Башкортостан. Генотипирование выполнено с использованием метода РТ-ПЦР. Установлена ассоциация генотипа rs17525472*TC гена *SCG3* с риском развития легкой формы БА у русских.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфный вариант, гистамин, ген секретогранина 3 *SCG3*, ген полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, *ADCYAP1*.

Бронхиальная астма (БА) – это гетерогенное заболевание, в основе которого лежит хроническое воспаление дыхательных путей. В настоящее время БА является одним из самых распространенных хронических заболеваний детского возраста [1]. Гистамин представляет собой центральный медиатор воспаления, уровень экспрессии которого находится под действием ключевых ферментов, участвующих в его метаболизме. Повышенный уровень свободного гистамина приводит к спазму гладкой мускулатуры бронхов, повышенной проницаемости сосудов, выработке слизи, последующему развитию обструкции и гиперчувствительности дыхательных путей [2].

В настоящее время известно более 200 генов, продукты которых вовлечены в метаболические пути гистамина. Выделяется несколько основных групп генов гистаминового метаболического пути: гены гистаминовых рецепторов (*HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4*), гены, участвующие в синтезе (*HDC*, *PRG3*), деградации (*HNMT*, *AOC1*, *MAOB*, *ALDH7A1*), секреции (*SNAP23*, *ADA*, *ADCYAP1*, *ADA*, *CSF2*) гистамина и др. (www.ebi.ac.uk/). В ряде полногеномных исследований БА обнаружены ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, с риском развития данного заболевания (*ADCYAP1*, *SCG3*, *PSAP*) (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). К настоящему моменту выполнены немногочисленные исследования полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, у пациентов с БА, в связи с тем

представляется актуальным исследование полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина у детей с БА различной этнической принадлежности.

Целью данной работы явилось исследование полиморфных вариантов генов полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, *ADCYAP1* и секретогранина 3 *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, у больных БА и в контрольной группе индивидов.

Материалы и методы. В работе использованы образцы ДНК 430 неродственных индивидов, проживающих на территории РБ, в возрасте 2-17 лет. Группу пациентов составили 236 больных бронхиальной астмой (70 девочек, 166 мальчиков) различной этнической принадлежности (русские – 84, татары – 108, башкиры – 44). Пациенты находились на стационарном лечении или обследовании в детских отделениях Клиники ФГБОУ ВО «БГМУ» Минздрава России и аллергологическом отделении ГБУЗ «РДКБ» г. Уфы. Критерием включения детей в группу наблюдения явился установленный диагноз заболевания в соответствии с GINA (Global Initiative for Asthma) и отечественными программными документами по диагностике, лечению и профилактике БА [3,4].

Оценка функции внешнего дыхания у больных БА и индивидов контрольной группы проводилась на компьютерном спирографе («Erich Jaeger», Германия) с анализом кривой «поток-объем». Оценивались следующие показатели (в процентах от должных величин, заложенных в компьютерную базу спирометра): жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1 сек. (ОФВ1), максимальные объемные скорости потока кривой в точках, соответствующих объему легких 75%, 50%, 25% ФЖЕЛ (МОС75, МОС50, МОС25, соответственно). Градации нормы и снижение параметров спирограммы в % от должностной величины для детей до 18 лет оценивались по Клементу Р.Ф. и Зильберу Н.А. [5].

В качестве контроля исследована группа практически здоровых детей без бронхолегочных, аллергических и аутоиммунных заболеваний с неотягощенной наследственностью в отношении аллергических заболеваний, состоящая из 194 человек (119 девочек, 75 мальчиков) соответствующей этнической принадлежности (русские – 75, татары – 83, башкиры – 36). У детей, включенных в группу контроля, был низкий уровень иммуноглобулина Е (IgE) и не было отклонений от нормальных показателей функции внешнего дыхания по данным спирографии или пикфлоуметрии. Все дети с 15 лет, участвующие в исследовании, и родители детей младше 15 лет дали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 7 от 10.02.2011 г.).

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфных вариантов rs17525472 (g.51677471T>C) гена секретогранина 3 *SCG3* и rs2231187 (c.456A>G, p.Lys152=) гена, полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, *ADCYAP1* проводили с использованием метода РТ-ПЦР согласно протоколу фирмы-производителя на приборе CFX96 («Bio-Rad», США).

Для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди-Вайнберга использовался критерий χ^2 . При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. В случае наличия достоверных отличий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95% доверительного интервала (CI95%).

Результаты и обсуждение. Выполнен анализ ассоциаций полиморфных вариантов rs17525472 гена *SCG3* и rs2231187 гена *ADCYAP1* с риском развития и клинико-

функциональными особенностями БА (течением заболевания, показателями спирографии и др.) у больных БА и в контрольной группе индивидов. При исследовании полиморфного локуса rs17525472 гена SCG3 выявлено, что менее распространенным является аллель rs17525472*С, обнаруженный в контрольной группе русских с частотой 8,67%, у татар – 11,59%, у башкир – 13,89% (табл.1). Обнаружено, что частота гетерозиготного генотипа rs17525472*ТС и аллеля rs17525472*С гена SCG3 у детей с легкой формой БА русской этнической принадлежности значительно выше (35,14% и 17,57%), чем в контрольной группе (17,33%, $p=0,04$, $OR=2,58$, 95%CI 1,05-6,36 и 8,67%, $p=0,05$, $OR=2,25$, 95%CI 0,98-5,13). Частота встречаемости генотипа rs17525472*ТТ и аллеля rs17525472*Т гена SCG3 у русских с легкой формой БА (64,86% и 82,43%) была более низкой, чем в группе контроля (82,67%, $p=0,04$, $OR=0,39$, 95%CI 0,16-0,95 и 91,33%, $p=0,05$, $OR=0,44$, 95%CI 0,19-1,02).

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов rs17525472 гена SCG3 и rs2231187 гена ADCYAP1 у больных БА и в контрольной группе.

Выборка		Генотипы / n (%)			Аллели / n (%)		N
rs17525472		ТТ	ТС	СС	Т	С	
Больные	Русские	63(75,9)	20(24,1)	-	146(87,95)	20(12,05)	83
	Татары	81(76,42)	21(19,81)	4(3,77)	183(86,32)	29(13,68)	106
	Башкиры	31(70,45)	10(22,73)	3(6,82)	72(81,82)	16(18,18)	44
Контроль	Русские	62(82,67)	13(17,33)	-	137(91,33)	13(8,67)	75
	Татары	63(76,83)	19(23,17)	-	145(88,41)	19(11,59)	82
	Башкиры	28(77,78)	6(16,67)	2(5,56)	62(86,11)	10(13,89)	36
rs2231187		АА	АG	GG	А	G	
Больные	Русские	40(48,19)	30(36,14)	13(15,66)	110(66,27)	56(33,73)	83
	Татары	57(53,77)	41(38,68)	8(7,55)	155(73,11)	57(26,89)	106
	Башкиры	29(65,91)	15(34,09)	-	73(82,95)	15(17,05)	44
Контроль	Русские	34(45,33)	36(48)	5(6,67)	104(69,33)	46(30,67)	75
	Татары	40(48,78)	30(36,599)	12(14,63)	110(67,07)	54(32,93)	82
	Башкиры	17(47,22)	18(50)	1(2,78)	52(72,22)	20(27,78)	36

Ген секретогранина 3 SCG3 кодирует белок, являющийся членом семейства нейроэндокринных секреторных белков хромогранинов/ секретогранинов. Гранины могут служить предшественниками биологически активных пептидов, однако точная функция данного белка на данный момент не установлена (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29106).

При GWAS исследовании пациентов европейского происхождения с тяжелой формой БА обнаружена выраженная тенденция к ассоциации полиморфного локуса rs17525472, расположенного вблизи гена SCG3, с риском развития БА [6], что частично согласуется с полученными нами данными. С использованием подхода GWAS установлена ассоциация другого полиморфного варианта rs35776517 гена SCG3 с развитием БА у индивидов афроамериканского происхождения [7].

При исследовании полиморфного варианта rs2231187 гена ADCYAP1 не выявлено статистически значимых различий частот аллелей и генотипов данного локуса между выборкой пациентов с БА и контрольной группой ($p > 0,05$). Частота редкого аллеля rs2231187*G гена ADCYAP1 в группе русских составила 30,67%, татар – 32,93%, башкир – 27,78% (табл.1).

Ген полипептида 1, активирующего аденилатциклазу, ADCYAP1 (PACAP) расположен в хромосомной области 18p11.32, кодирует белки, стимулирующие аденилатциклазу и повышающие уровни циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что приводит к активации транскрипции целевых генов, участвует в секреции гистамина (www.ebi.ac.uk/). PACAP представляет собой нейропептид, гомологичный вазоактивному кишечному полипептиду (VIP), вызывающему высвобождение гистамина в тучных клетках кожи человека. Показано, что подкожная инъекция продуктов метаболизма PACAP вызывает значительное высвобождение гистамина [8]. Полиморфный вариант rs2231187 гена ADCYAP1 исследован при GWAS БА у детей европейского происхождения, однако полученные результаты не достигли уровня статистической значимости [9], в нашем исследовании также не обнаружено ассоциации данного полиморфного локуса с риском развития БА. По результатам GWAS исследований также обнаружены ассоциации полиморфных локусов гена ADCYAP1 с развитием других многофакторных заболеваний (www.ebi.ac.uk/gwas/variants/rs1893154).

Таким образом, проведено исследование полиморфных вариантов rs17525472 гена секретогрфина 3 SCG3 и rs2231187 гена, полипептида 1, активирующего аденилатциклазу ADCYAP1 у детей с БА и в соответствующей контрольной группе из РБ. Установлено, что генотип rs17525472*TC гена SCG3 ассоциирован с риском развития БА у русских. Полученные в данной работе результаты вносят определенный вклад в понимание механизмов развития и патогенеза БА.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (АААА-А21-121011990119-1) и проекта ФЦП № 05.621.21.0033 «Создание и развитие научно-технологической платформы Уфимского Федерального исследовательского центра РАН на базе РЦКП "Агидель" для реализации приоритетов Российской Федерации в области медицины, сельского хозяйства, разработки катализаторов для реализации энергосберегающих технологий и получения новых материалов для молекулярной электроники», при частичной поддержке РФФИ (проект № 19-315-90055). Образцы ДНК для исследования использованы из «Коллекции биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Литература

1. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». Под ред. Чучалина А. Г. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-маркет; 2017. 161 с.

2. Yamauchi K., Ogasawara M. The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy *Int J Mol Sci.* 2019 Apr; 20(7): 1733. doi: 10.3390/ijms20071733
3. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2020. P. 1-209.
4. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». Под ред. Чучалина А. Г. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-маркет; 2012. 184 с.
5. Клемент Р.Ф., Зильбер Н.А. Функционально-диагностические исследования в пульмонологии: методические рекомендации. С-Пб.:1993. 43.
6. Li X., Howard T.D., Zheng S.L. et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions // *Multicenter Study J Allergy Clin Immunol.* 2010 ;125(2): 328-335.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.018.
7. Rafaels N.M., Johnston H.R., Huang L. et al. How well does whole genome sequencing improve ability to detect association with Asthma in candidate genes compared to existing GWAS platforms in African American populations? *J Allergy Clin Immunol*, 2015 (2): AB164 Abstracts.
8. Olesen I. J., Pedersen S. H. PACAP and its receptors in cranial arteries and mast cells // *The Journal of Headache and Pain.* 2018; 19 (16). DOI 10.1186/s10194-017-0822-2.
9. Litonjua A.A., Lasky-Su J., Schneiter K. et al. *ARG1* is a novel bronchodilator response gene: screening and replication in four asthma cohorts // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2008. Vol. 178 (7): 688-694. DOI: 10.1164/rccm.200709-1363oc.

Association analysis of polymorphic variants in genes involved in histamine metabolism with asthma development in children

*O.N. Savelieva¹, *A.S. Karunas^{2,3}, Yu.Yu. Fedorova^{2,4}, E.I. Etkina³, E.K. Khusnutdinova^{2,4}

1 - *Bashkir State University*

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

2 - *Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences*

71 Pr. Oktyabrya Street, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

3 - *Bashkir State Medical University*

3 Lenina Street, 3450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

*e-mail: olyasavelie@yandex.ru; carunas@list.ru

Histamine is one of the most important biogenic amine that is involved in the cell and system regulation and it is one of the main mediators of immediate-type allergic reactions. The aim of this work was to investigate the polymorphic variants of secretogranin 3 *SCG3* (rs17525472) and adenylate cyclase activating polypeptide 1 *ADCYAP1* (rs2231187) genes involved in the histamine metabolism in children from the Republic of Bashkortostan. Genotyping was performed using RT-PCR. The association of the rs17525472*TC genotype of the *SCG3* gene with the risk of mild BA in Russians was established.

Key words: bronchial asthma, polymorphic variant, histamine, secretogranin 3 *SCG3* gene, adenylate cyclase activating polypeptide 1 *ADCYAP1* gene.

Крым-сагыз – полузабытый каучуконос и его латинские названия

© А.М. Сагитов¹, Б.Р. Кулуев², А.В. Чемерис^{2*}

¹ООО Рост-Консалт

Россия, Республика Башкортостан, 450000, Уфа, ул. Крупской, 9

²Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Россия, Республика Башкортостан, 450054, Уфа, пр. Октября, 71

*Email: chemeris@anrb.ru

О том, что оказавшийся почти забытым как каучуконос одуванчик осенний *Taraxacum hybernum* Stev. или крым-сагыз может служить источником натурального каучука, было выяснено лишь в 1931 г., хотя этот вид растений был известен задолго до этого, претерпев множественные переименования латинских названий. Считается, что существуют два близких вида – эндемик Крымского побережья *T.hybernum*, полный пластидный геном которого нами недавно секвенирован, и распространенный по югу Западной Европы *T.megalorhizon*. Для уточнения взаимоотношений этих видов необходимо секвенировать пластидный геном последнего.

Ключевые слова: крым-сагыз, одуванчик осенний, *Taraxacum hybernum*, каучуконос.

У большого числа растений с момента их открытия многими поколениями ботаников были многократно изменены их видовые и родовые названия. При этом часть из них стали относить к иным семействам и даже порядкам. И это вполне нормально, поскольку постоянно шел процесс познания, и в систематике растений происходили (преимущественно) вполне оправданные в конкретный момент времени изменения.

В данной публикации мы обратили внимание на отечественный каучуконос прошлого - одуванчик осенний или крым-сагыз *Taraxacum hybernum* Stev., причем здесь для него приведено далеко не первое, но принятое в настоящее время в нашей стране наименование, хотя и некоторые прежние его латинские названия у ботаников, что называется в ходу. При этом на других территориях произрастания этого одуванчика они, возможно, относятся все же не к крым-сагызу, а к его ближайшим сородичам, что еще предстоит уточнить. При этом нужно заметить, что молекулярная геносистематика до этих видов пока не добралась, поскольку с ее помощью наверняка могли бы быть получены новые данные, проясняющие ситуацию.

Одуванчик крым-сагыз это свое название получил в начале 1930-х гг., после того как его каучуконосность установили украинские ботаники М.И.Котов и В.И.Черкасов [1], по аналогии с обнаруженными приблизительно в те же годы другими корневыми каучуконосами – тау-сагызом (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. & Bosse) и кок-сагызом (*T.kok-saghyz* Rodin).

И здесь требуется небольшое отвлечение. В годы Великой Отечественной войны Котов не прекратил ботанические исследования и, будучи эвакуированным в составе

Академии наук УССР в Уфу, изучал флору Башкирии, разработал ее ботанико-географическое районирование, был инициатором и ведущим автором изданного в 1966 г. «Определителя растений Башкирской АССР», за что в 1967 г. получил почетное звание Заслуженного деятеля науки БАССР и в Башкирской энциклопедии о нем есть соответствующая статья, подготовленная другим известным ботаником Е.В. Кучеровым. Поэтому можно считать, что крым-сагыз и Башкортостан неким образом связаны между собой уже давно.

Вернувшись в начало 1930-х гг. нельзя обойти вниманием другую работу Котова и Черкасова [2], в которой они описывают как, «экскурсируя» поздней осенью 1931 г. в окрестностях Гурзуфа, около Никиты и вблизи Ялты, ими обнаружены цветущие одуванчики *T.gymnanthum* DC., довольно подробно коснувшись в этой статье вопросов систематики данного вида. Ранее отечественным ботаникам этот вид был также известен как одуванчик осенний *T.hybernum*, описанный в 1856 г. директором-основателем Никитского ботанического сада россиянином, шведом по происхождению Х.Стевенем [3]. Эта его публикация вышла в являющемся в настоящее время старейшим отечественным журналом по естествознанию – Бюллетене Московского общества испытателей природы, называвшимся тогда по-французски Bulletin de la Societe Imperiale des Naturalistes de Moscou. Но за столетие до этого в начале 1760-х гг. подающий большие надежды ученик К.Линнея Р.Forskål, путешествуя по Египту и Ближнему Востоку, описал этот или другой очень близкий к нему вид, назвав его *Leontodon megalorhizos* Forsk., что, в том числе, свидетельствовало о его крупных корнях. Однако публикация с описанием *L.megalorhizos* вышла только в 1775 г. после смерти Forskål (наступившей в раннем возрасте от малярии), подготовленная единственным выжившим участником той экспедиции С.Niebuhr [4]. Котов и Черкасов [2] упоминают, что еще более раннее название этого растения было *L.minimum* Brig., но на web-ресурсе List of botanists by author abbreviation (https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_botanists_by_author_abbreviation), где приведены фамилии наиболее значимых ботаников всего мира с присущими им аббревиатурами на странице V.Briganti https://species.wikimedia.org/wiki/Vincenzo_Briganti говорится, что нет растений, описанных этим итальянским ботаником, хотя эти сведения могут быть не очень верны. В той же своей статье 1933 г. [2] Котов и Черкасов пишут, что в Европе этот вид одуванчика известен также под латинскими названиями *T.autumnale* Cost., *T.humiusum* Heldr., *T.micranthum* DC. Но это еще не все синонимы одного и того же или очень близких видов одуванчика. И на некоторых из них мы далее более подробно остановимся.

В 1822 г. был описан новый, близкий к нынешнему крым-сагызу вид (возможно, тот же самый), названный *L.daedaleus* Sieber; в 1832 г. сочли, что нужно выделить вид *L.gymnanthus* Link., а чуть позже в 1838 г. он был переименован в *T.gymnanthum* (Link.) DC. Наконец, Стевен на другой территории, а именно в Крыму описал этот вид как *T.hybernum*, о чем мы уже говорили выше. Но на этом переименования данного одуванчика или близкого к нему вида, либо параллельное использование его/их разных названий не закончились. В третьем томе Flora Orientalis 1875 г. издания [5] приводятся несколько видов одуванчиков, которые могут нас интересовать. Так, помимо *T.gymnanthum*, про который говорится, что его синонимом является *T.hybernum*, упоминается также *T.officinale* ssp. *laevigatum* Bisch. Sich., и о нем сообщается, что он цветет осенью и имеет более толстое корневище, что совпадает с признаками крым-сагыза. Однако про нынешний вид *T.laevigatum* (Willd.) DC. (<https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Taraxacum+laevigatum>) сейчас можно прочесть, что он распространен в Европе, но цветет с апреля по июнь.

В конце XIX столетия вышло «Руководство для определения семенных и высших споровых растений флоры средней и южной России, Крыма и Северного Кавказа» за авторством И.Шмальгаузена [6], в котором во втором томе дается описание *T.gymnanthum*, про который говорится, что он имеет толстый корень, а местами его

произрастания, кроме Крыма, указываются Южная Франция, Италия, Греция, Византия, Малая Азия, Сирия. Приводится также его синоним – *T.hybernum*. В 1907 г. *L.megalorhizos* стал называться *T.megalorhizon* (Forssk.) Hand.-Mazz., сменив не только родовое название, но и окончание видового имени; в 1913 г. посчитали, что нужно признать существование *T.officinale* subsp. *gymnanthum* (Link.) Cout. В статье [7], посвященной анализу природных ресурсов СССР в виде каучуконосов и гуттаперченосов, рассмотрен целый ряд видов таких растений, включая крым-сагыз, латинское наименование которого приведено в ней как *T.megalorhizon*. Таким образом, только для одуванчика, обитающего в Крыму, разными отечественными авторами в XX веке использовано три его латинских видовых названия – *gymnanthum*, *hybernum* и *megalorhizon*.

В настоящее время принято считать, что имеется два близких вида - *T.megalorhizon*, произрастающий преимущественно по югу Западной Европы (<https://www.qbif.org/species/9643751>), тогда как *T.hybernum* обитает на побережье Крыма. Однако в августе 1962 г. Е.Победимовой и В.Гладковой в окрестностях Севастополя в бухте Камышовой на глинисто-известняковом обрыве у моря был найден другой вид одуванчика, который описан Б.К.Шишкиным как *T.pobedimoviae* Schischk., про который в книге «Флора СССР» 1964 г. на стр. 531 под номером 160 говорится, что это «Р. 6 – 20 см. выс., с **очень толстым** (выделено нами), обычно многоглавым корнем» [8]. В том же издании под номером 159 фигурирует одуванчик *T.hybernum*, про который сказано, что это эндемичный вид для Крымского побережья и приведены его синонимы. Первым дан *T.gymnanthum*, в качестве другого синонима указан *T.megalorhizon*. При описании хозяйственного значения *T.hybernum* отмечается, что в его латексе содержится относительно большой процент каучука и что открыт он как каучуконос Котовым и Черкасовым в 1931 г. В книге «Флора Европейской части СССР» 1989 г. издания в томе VIII [9] под номерами 146 и 145 соответственно также приведены оба этих вида, но про *T.pobedimoviae* говорится, что его самостоятельность нуждается в подтверждении на более обильном материале.

Возвращаясь к одной из первых статей [2], в которых описывается каучуконосность *T.gymnanthum* (*T.hybernum*), нужно сказать, что Котов и Черкасов проявили вполне оправданный интерес к своему открытию и проанализировали насчитывающий не одно десятилетие гербарный материал, собранный задолго до них и хранящийся в Украинском Институте растениеводства. Так, ими были исследованы гербарные образцы того же вида одуванчика, собранные фон Граффом в 1860 г. в Крыму возле Никиты. Несмотря на 70-летнюю давность в их корнях сохранились нити каучука, которые легко очищались от древесины корня простым перетиранием его руками. В гербарии другого известного российского ботаника Н.С.Турчанинова, собранного им в Греции (Афины) и датированном 1851 г., тяжи каучука в корнях его одуванчика также были в отличной сохранности. Определив в собранных ими самими образцах крым-сагыза содержание смол и каучука, составившие около 3% и 6-9%, соответственно, Котов и Черкасов высказали предположение, что этот вид одуванчика может служить в качестве одного из источников натурального каучука в Советском Союзе [2], что позже и произошло. При этом серьезную конкуренцию крым-сагызу тогда составили другие корневые каучуконосы – тау-сагыз и в особенности кок-сагыз, как менее требовательный к теплоте климату в отличие от крым-сагыза. Однако в 1930-1940-ые гг. в СССР велись также работы по доместикации крым-сагыза и были найдены несколько его форм – бурсемянная, белосемянная и розовосемянная, характеризующиеся некоторыми отличиями в продукции каучука [10]. Но в начале 1950-х гг. выращивание каучуконосов в нашей стране закончилось, отчасти по причине восстановления поставок гевейного каучука из Юго-Восточной Азии, но, главным образом, благодаря созданию новой технологии получения синтетического каучука. Однако следует отметить, что натуральный каучук обладает свойствами, которых пока не могут добиться химики-синтетики для искусственного каучука и поэтому спрос на натуральный каучук в мире в последние годы растет, поскольку он требуется для высококачественных шин, в том числе для большегрузных

автомобилей и особенно для авиационной промышленности. Поэтому в настоящее время, интерес к кок-сагызу как каучуконосу возрождается в разных странах, тогда как крым-сагыз оказался практически позабыт. Кроме нас [11 - 13] крым-сагызом, можно сказать, никто в мире не интересуется. И напрасно. Нами с коллегами в Крыму заново найдены его бурсемянная и розовосемянная формы. Белосемянную пока найти не удалось. Поскольку *T.hybernum* является апомиктичным видом и подвержен незначительной изменчивости нами проведены эксперименты по выявлению полиморфизма его ДНК [14, 15], которые будут продолжены. Нами также секвенирован полный пластидный геном крым-сагыза размером 151279 п.н., сравнительный анализ которого показал, что этот вид достаточно близок к кок-сагызу и удален от одуванчика лекарственного (статья готовится к печати). Для прояснения родства *T.hybernum* и *T.megalorhizon* необходимо секвенировать пластидный геном последнего, что даст однозначный ответ насколько эти виды близки или самостоятельны, поскольку геномы хлоропластов достаточно консервативны в эволюции.

Литература

1. Котов М.И., Черкасов В.Т. Новое каучуконосное растение – одуванчик осенний // Советский каучук. 1932. № 4. С. 26–28.
2. Котов М., Черкасов Вл. Новое каучуконосное растение – одуванчик осенний (*Taraxacum gymnanthum* D.C.), произрастающее на Южном берегу Крыма // Природа. 1933. № 2. С.63-65.
3. Steven C. Verzeichniss der auf der taurischen Halbinsel wildwachsenden Pflanzen // Bulletin de la Societe Imperiale des Naturales de Moscou. 1856. T.29. No.4. P.339-418.
4. Forskål P. Flora Aegyptiaco-Arabica sive Descriptiones Plantarum, quas per Aegyptum Inferriorem et Arabian Felicem detexit, Illustravit Petrus Forskål prof. Haun. post mortem Auctoris editit Carsten Niebuhr. 1775.
5. Boissier E. Flora Orientalis sive Enumeratio Plantarum in Oriente a Grecia et Aegypto ad indle fines Hucusque Observatarum. Volmen Tertium. 1875.
6. Шмальгаузен И. Флора Средней и южной России, Крыма и Северного Кавказа. Руководство для определения семенных и высших споровых растений. 1898. Т.2.
7. Лапин А.К. Каучуконосы и гуттаперченосы СССР // Природа. 1936. №7. С.110-123.
8. Флора СССР. 1964. Т.29.
9. Флора европейской части СССР. 1989. Т.8.
10. Филиппов Д.И., Ничипорович А.А., Аксельрод Д.М. Культура каучуконосов в СССР // М., Сельхозгиз. 1948. 359 С.
11. Кулуев Б.Р., Картуха А.И., Князев А.В., Фатерыга А.В., Чемерис А.В. Опыт выращивания *Taraxacum hybernum* (Asteraceae) // Растительные ресурсы. 2017. №4. С.543-554.
12. Knyazev A., Kuluev B., Fateryga A. Yasybaeva G., Chemeris A. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Taraxacum hybernum* Steven // Plant Tissue Culture and Biotechnology. 2017. V. 27, P. 141-151.

13. Гаршин М.В., Кулуев Б.Р. Крым-сагыз: Особенности растения, перспективы возделывания и селекция (Обзор) // Аграрная Россия. 2018. №4, С.40-48.

14. Кулуев Б.Р., Фатерыга А.В., Кулуев А.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR, RAPD и ISSR-маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т.22. №1. С. 102-107.

15. Bari G., Gainullina K.P., Gumerova G.R., Uteulin K.R., Golovanov Ya., Chemeris A.V., Kuluev B.R. Multilocus DNA polymorphism of some rubber-bearing dandelions (*Taraxacum* spp.) of Russia and Kazakhstan // Genet Resour Crop Evol. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01233-1>

Krym-saghyz – half-forgotten rubber-bearing plant and its Latin names

A. M. Sagitov¹, B. R. Kuluev², A. V. Chemeris² *

¹*Rost-Consult LLC*

9 Krupskaya str. 450000, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

²*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences*

71 Prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

**Email: chemeris@anrb.ru*

The fact that the almost forgotten as rubber-bearing plant dandelion *Taraxacum hybernum* Stev. or Krym-saghyz can serve as a source of natural rubber was found out only in 1931, although this plant species was known long before that, having undergone multiple renaming of Latin names. Now there are two close species - *T. hybernum*, endemic to the Crimean coast, the full plastid genome of which we have recently sequenced, and *T. megalorhizon*, distributed in the south of Western Europe. To clarify the relationship of these species, it is necessary to sequence the plastid genome of the latter.

Keywords: Krym-saghyz, dandelion, *Taraxacum hybernum*, rubber-bearing plant.

Влияние природно-климатических условий на популяции лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

© З.Р. Саитова

Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

Email: fleurzily@yandex.ru

Для оценки влияния природно-климатических условий на популяции лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl. произрастающие в различных природных зонах (горно-лесной и лесостепной) был проведен анализ морфометрических показателей лишайника (масса, длина, площадь таллома, число апотеций и лопастей), размера его составляющих компонентов (фото- и фитобионт), а также определено содержание фитогормонов. Проведен анализ количественного и качественного состава соединений фенольной природы в лишайниках, внесших вклад в формирование общего антиоксидантного статуса.

Ключевые слова: лишайники, фитогормоны, флавоноиды, антиоксидантный статус

Лишайники являются частью любой экосистемы. Они способны выживать в экстремальных условиях среды. На жизненные процессы любого организма оказывают влияние как абиотические, биотические так и антропогенные факторы. Лишайники особенно чувствительны к изменениям среды. На их рост и развитие оказывают влияние все факторы среды как природные, так и антропогенные, приводя либо к угнетению ростовых и физиологических процессов, либо наоборот прогрессивному росту и развитию [1].

Цель работы определить влияние природно-климатических условий на популяции лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl. произрастающие в различных природных зонах. А именно горно-лесной и лесостепной зонах.

Исследования популяций лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl. проводились в Ишимбайском (горно-лесная зона) и Альшеевском (лесостепная) районах Республики Башкортостан.

Проанализировав морфометрические показатели лишайников популяции *P. stellaris* на разных этапах онтогенеза, произрастающих в данных исследуемых районах (Ишимбайском и Альшеевском) значимых различий между анализируемыми показателями не выявлено (табл.1) Такое незначительное различие в морфометрических параметрах возможно связано с условиями обитания лишайников. Ведь как видно из таблицы 1 по показателям освещенности и влажности воздуха, наиболее освещенными и относительно влажными, являются леса Ишимбайского района по сравнению с лесами Альшеевского района.

Лишайники имеют способность аккумулировать в талломе различные вещества. И так как они чувствительны к содержанию в атмосфере соединений серы нами был проведен анализ содержания оксида серы (VI) в талломе лишайника *P. stellaris*. Как показано

в таблице 1, процентное содержание оксида серы (VI) в образцах лишайников, собранных в исследуемых районах, было почти одинаковое и отличается всего лишь на 0,02% масс.

Таким образом, природно-климатические зоны приводят к сложению определенных условий (освещенность, влажность и т.д.) для формирования популяций *P. stellaris* и наиболее благоприятными условия для роста лишайников имелись в условиях горно-лесной зоны.

Таблица.1 Морфометрические показатели ценопопуляций *Physcia stellaris* (L.)Nyl. произрастающих в разных природных зонах

Показатели	Место сбора	
	Альшеевский район	Ишимбайский район
Биомасса, г	0,15±0,06	0,12±0,05
Длина, мм	15,8±2,5	16,4±3,4
Площадь, мм ²	168,1 ±16,5	161,2±18,3
Число апотециев, шт	87,1 ±8,9	84,3±11,4
Число лопастей	31,0±1,9	33,1±2,1
Содержание воды в сырых лишайниках, %	20,3±2,46	46,4±6,02
Снижение освещенности **, %	62±2,2	78±1,9
Повышение относительной влажности воздуха ***, %	6±1	8±2
Содержание SO ₃ , % масс	1,31±0,04	1,29±0,04

*различия между образцами районов достоверны при $P \leq 0,05$

** разница между освещенностью под пологом леса и открытого места

*** разница между относительной влажностью воздуха под пологом леса и открытого места в безветренную погоду

Все физиологические процессы (рост, развитие, старение и т.д.) в растениях контролируются фитогормонами. Определено, что они осуществляют регуляцию последовательности всех этапов развития растений, а также их ответную реакцию на внешние воздействия на генетическом уровне. Особенно важными среди них являются ауксин (ИУК), абсцизовая кислота (АБК) и цитокинины, т.к. они выполняют ключевую роль в развитии растений [2]. Значимую роль данные фитогормоны выполняют и в грибковых симбиозах, таких как микориза. Фитогормоны, выделяемые корнями растений, влияют на метаболизм и рост микоризных грибов, а фитогормоны грибного происхождения влияют на морфологию, метаболизм и рост растения [3].

Роль фитогормонов в этапах развития лишайников мало известна [4]. Это связано с тем, что рост у лишайников протекает очень медленно и длится иногда десятилетиями, а гормональную регуляцию, связывают, с достаточно быстро протекающими физиологическими процессами. Однако можно говорить об определенном гормональном статусе, который формируется под действием природных факторов среды (освещенность, влажность и др.) при эпизодическом «пробуждении» лишайников и является необходимым для запуска и регуляции в них физиолого-биохимических процессов и, в конечном итоге, ростовых процессов.

Для оценки влияния фитогормонов на рост компонентов лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl. были измерены размеры клеток водорослей и гифов гриба, полученные результаты занесли в таблицу 2.

Таблица 2. Размеры компонентов лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

№	Место сбора	Клетки гифов гриба, мкм ³	Клетки водорослей, мкм ³
1.	Альшеевский район	41,6±5,1	1767±207
2.	Ишимбайский район	69,4 ±7,2	2438±378

Согласно приведенным данным таблицы 2 видно, что размеры и объемы клеток у лишайников, выросших в разных условиях среды различны. Так наибольший размер клеток водорослей наблюдался у лишайников, собранных в Ишимбайском районе, их размер в среднем достигал 2438±378 мкм³. Так же установлено, что размеры фитобионта лишайников из Ишимбайского района (2438±378 мкм³) были больше, по сравнению с образцами из Альшеевского района (1767±207 мкм³). Такое различие, скорее всего, связано с природно-климатическими условиями (влажность, освещенность и т.д.) произрастания лишайников. Сравнивая размеры клеток водорослей с клетками гифов гриба можно сказать, что наибольшее угнетение процессов роста наблюдается у клеток фитобионта (табл. 2).

Таблица 3. Содержание гормонов в лишайниках *Physcia stellaris* (L.) Nyl. нг/г сухой массы

№	Место сбора	ИУК	АБК	Цитокинины			
				Сумма	ZN	ZR	Z
1.	Альшеевский район	34±4	102±9	96±10	16±1,1	26±2	34±2,7
2.	Ишимбайский район	43±3,6	78±6	71±9	18±2	38±2,3	8±0,5

Примечание. ИУК – индолил-3-уксусная кислота, АБК – абсцизовая кислота, ZN – зеатиннуклеотид, ZR – зеатинрибозид, Z – зеатин.

В таблице 3 отражены данные о содержании гормонов ИУК, АБК и цитокининов (производных зеатина), определенных для оценки состояния гормональной системы лишайников *Physcia stellaris* (L.) Nyl., выросших в разных экологических условиях.

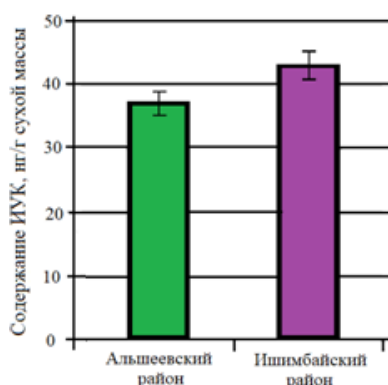


Рис. 1. Содержание ауксинов в лишайниках *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

Наибольшее содержание фитогормона ИУК в лишайниках из двух указанных районов было у лишайников Ишимбайского района, и в среднем достигала 43±3,6 нг/г сухой массы. по сравнению с лишайниками из Альшеевского района, где его содержание было в среднем 34±4 нг/г сухой массы. Ауксины в растениях, под воздействием окружающей среды [5], стимулируют рост клеток путем растяжения [6], поэтому можно предположить, что у лишайников Ишимбайского района (горно-лесная зона) в периоды роста

и развития содержание данного гормона было относительно высоко, что и привело к формированию наиболее крупных клеток гриба и водоросли (табл. 2).

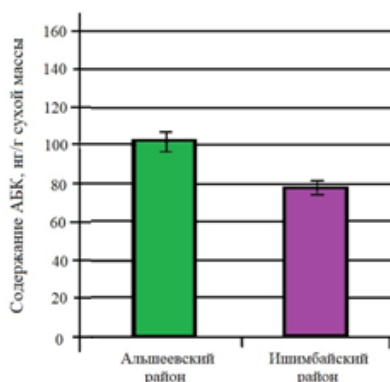


Рис. 2. Содержание АБК в лишайниках *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

Концентрация фитогормона АБК как известно, увеличивается в результате понижения содержания воды в тканях растений [6], с чем возможно связано высокое содержание абсцизовой кислоты в лишайниках Альшеевского района (102 ± 9 нг/г сухой массы) по сравнению с лишайниками Ишимбайского района (78 ± 6 нг/г сухой массы). Так как содержание воды согласно таблице 1 в образцах лишайников из Альшеевского района ($20,3 \pm 2,46\%$) было в 2 раза ниже, чем в лишайниках Ишимбайского района ($46,4 \pm 6,02\%$), а содержание фитогормона АБК в 1,5 раза выше. Наличие достоверно высокого уровня содержания гормона АБК в образцах из Альшеевского района по сравнению с образцами Ишимбайского района (табл. 3), не оказало влияния на морфологические показатели лишайников (табл. 1), но возможно привело к развитию не больших по размеру клеток у лишайников (табл. 2).

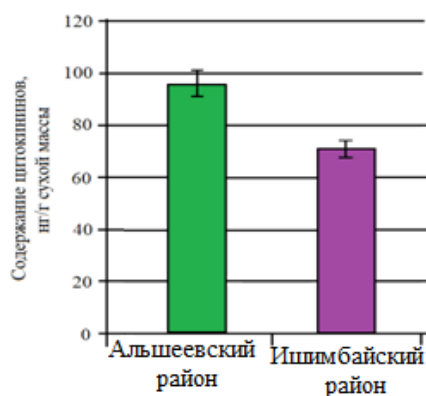


Рис. 3. Содержание суммы цитокининов в лишайниках *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

Определение содержания общей суммы цитокининов в образцах лишайников показал, что их наибольшее количество содержится в лишайниках из Альшеевского района – 96 ± 10 нг/г сухой массы, а образцы лишайников из Ишимбайского района содержали 71 ± 9 нг/г сухой массы цитокининов (табл. 2, рис. 3). Так как цитокинины стимулируют процесс деления клеток, то возможно, за счет этого сформировались внешние размеры талломов сопоставимые с ростовыми характеристиками лишайников из Ишимбайского района (табл. 1).

Таким образом, нами была установлена роль гормональной системы в регуляции ростовых процессов лишайников *Physcia stellaris* (L.) Nyl, в первую очередь через возможную регуляцию процессов клеточного деления и размеров клеток симбионтов.

В адаптации растений к внешним условиям среды важную роль играют также флавоноиды [7]. Поэтому представило интерес установить какая взаимосвязь существует между содержанием флавоноидов, и их влиянием на рост лишайников в разных природно-климатических условиях.

Было определено количественное и качественное содержание флавоноидов в лишайнике *Physcia stellaris* (L.) Nyl. (табл. 4). Так высокое суммарное содержание флавоноидов на единицу массы было установлено в образцах из Ишимбайского района по сравнению с Альшеевским районом, где содержание флавоноидов было меньше. Детальный анализ качественного состава флавоноидов показал, что в лишайниках из Ишимбайского района в высоких концентрациях содержатся нарингин, дигидрокверцетин и кверцетин. В образцах, полученных из Альшеевского района среди выше указанных флавоноидов с высокой концентрацией содержанию был рутин. Разный уровень содержания различных групп флавоноидов, вероятно, связан с особенностями процессов метаболизма фенольных соединений [8].

По видовому содержанию соединений фенольной природы лидировали лишайники Ишимбайского района. В них было определено 128 видов флавоноидов, в образцах из Альшеевского района было обнаружено – 78 видов. Различия в количественном и качественном составе между образцами Ишимбайского и Альшеевского районов, вероятно, связаны с нахождением их в разных природных зонах – горно-лесной и лесостепной соответственно.

Таблица 4. Содержание флавоноидов и их антиоксидантный статус в *Physcia stellaris* произрастающих в разных условиях

Параметр	Соединение						Всего
	Дигидро-кверцетин	Нарингин	Рутин	Кверцетин	Нарингенин	Физетин	
ТЕАС*, мМ	1,9	0,5	2,4	4,7	1,53	0,8	
Альшеевский район							
Содержание, мг/г сух массы	6,5±0,7	0,95±0,06	7,5±0,8	1,6±0,08	2±0,3	0	18,5
Антиоксидантный статус	12,35	0,48	18	7,52	3,06	0	41,4
Ишимбайский район							
Содержание, мг/г сух массы	9,5±0,7	7,5±0,5	0,5±0,05	7,55±0,8	0,7±0,0 ₁	4,5±0,5	30,2
Антиоксидантный статус	18,05	3,75	1,2	35,49	1,07	3,6	63,1

Примечание. Значение ТЕАС (тролокс-эквивалент (ТЕАС, trolox equivalent antioxidant capacity), мМ по Н.А. Тюкавкиной (2008).

Установлено, что разные виды лишайников, произрастающие в сходных условиях, имеют различный качественный и количественный состав флавоноидов [9,10]. Однако установление флавоноида на межпопуляционном уровне типичного для популяции лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl., который позволил бы выявить достаточно четкую его связь с природно-климатическими условиями, нам не удалось обнаружить.

Определение содержания флавоноидов в лишайнике позволило установить их роль в формировании общего антиоксидантного статуса (табл. 4), который можно использовать как показатель ответной реакции организма растения на стрессовую нагрузку [11].

Анализа формирования антиоксидантного статуса показал, что высокий антиоксидантный статус наблюдался в образцах лишайников из Ишимбайского района – 63,16, а минимальный был определен в лишайниках из Альшеевского района. В становлении высокого антиоксидантного статуса в лишайниках из Ишимбайского района важную роль играют кверцитин, дигидро-кверцетин и нарингенин, а в Альшеевском районе – рутин и дигидро-кверцетин (табл. 4).

Таким образом, нами было установлено количественное и качественное разнообразие веществ фенольной природы в образцах лишайников, собранных в горно-лесном, лесостепной зонах. В горно-лесной зоне (Ишимбайский район) было определено максимальное видовое разнообразие (128) и содержание флавоноидов в образцах, и был подсчитан самый высокий потенциальный антиоксидантный статус веществ фенольной природы.

Нам не удалось установить взаимосвязь между антиоксидантной активностью флавоноидов и внешними природно-климатическими условиями произрастания лишайников. Вероятно, наиболее значимой в реализации адаптационных механизмов является вариабельность состава и концентрации индивидуальных фенольных соединений в таломе лишайников под действием естественных факторов.

Литература

1. Абдульманова С.Ю., Эктова С.Н. Изменение скорости роста кустисторазветвленных лишайников рода *Cladonia* в ходе пирогенных сукцессий на севере Западной Сибири. // Сибирский экологический журнал. 2015. №3. С 398-412
2. Gogala N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. // Experientia, 1991, 47:331–340
3. Pozo MJ, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, García-Garrido JM (2015) Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. // New Phytol 205:1431–1436
4. Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. Nature 459:1071–1078
5. Ott S., Krieg T., Spanier U., Schieleit P. Phytohormones in lichens with emphasis on ethylene biosynthesis and functional aspects on lichen symbiosis // Phytol Annales Rei Botanicae. 2001. Vol. 40, is. 3. PP. 83–94.
6. Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р. Фархутдинов Р.Г. Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом. – М. Наука, 2007, 158 с.
7. Epstein E., Sagee O., Cohen JD., Garty J. Endogenous auxin and ethylene in the lichen *Ramalina duriaei*. // Plant Physiol. 1986;82: 1122-1125.
8. Запретов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
9. Загоскина Н.В., Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Заварзин А.А., Заварзина А.Г. Водорастворимые фенольные соединения у лишайников. // Микробиология. 2013. Т. 82. №4. С. 434–441.

10. Загоскина Н.В., Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Заварзина А.Г., Заварзин А.А. О содержании фенольных соединений в различных видах лишайников Кольского полуострова. // Химия растительного сырья. 2011. №4. С. 245–249.
11. Щербаков А.В., Даутова Г.Р., Усманов И.Ю. Межпопуляционная изменчивость флавоноидов хелатирующего комплекса солодки Коржинского *Glycyrrhiza Korshinskyi* на Южном Урале. // Вестник Башкирского университета. 2014. Т. 19. №1. С. 67–74.

Influence of climatic conditions on the population of the lichen *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

Z.R. Saitova *, R.G. Farkhutdinov

Bashkir State University, Russia, 450076 Ufa, street Zaki Validi, 32.

**Email: fleurzily@yandex.ru*

To assess the impact of natural and climatic conditions on the population of the lichen *Physcia stellaris* (L.) Nyl. growing in various natural zones (mountain-forest and forest-steppe), an analysis of the morphometric parameters of lichen (weight, length, thallus area, number of apothecia and lobes), the size of its constituent components (photo- and phytobiont) was carried out, and the content of phytohormones was also determined. The analysis of the quantitative and qualitative composition of phenolic compounds in lichens, which contributed to the formation of the general antioxidant status, was carried out.

Keywords: lichens, phytohormones, flavonoids, antioxidant status

Клинико-лабораторные и биохимические аспекты диагностики кардиоваскулярных осложнений у детей и подростков с ожирением

© Ю.Г. Самойлова¹, О.А. Олейник¹, Е.В. Саган¹, Н.С. Денисов^{1*}

¹Сибирский государственный медицинский университет, кафедра детских болезней 634050, г. Томск, Московский тракт 2

*Email: denisov.ssmu@gmail.com

Цель исследования – установить вклад клинико-лабораторных и метаболических факторов риска развития кардиоваскулярных нарушений в формировании персонализированного подхода диагностики при ожирении у детей и подростков. Определение состава кишечной микробиоты производилось по методу Осипова, гормональные исследования осуществлялись методом ИФА. По результатам работы у детей с ожирением выявлено увеличение концентрации инсулина, триацилглицеролов и лептина, снижение концентрации ТМАО, инкретинов, глюкагона и резистина, в тонком кишечнике увеличена общая бактериальная и вирусная нагрузка, снижено видовое разнообразие, в микробиоте толстого кишечника отмечено снижение количества резидентной микрофлоры.

Ключевые слова: ожирение, кишечная микробиота, триметиламиноксид, глюкагоноподобный пептид.

Ожирение у детей и подростков в последнее время является одной из актуальных проблем современного здравоохранения. В развитых странах ожирение достигло уровня эпидемии и наблюдается прогрессирующий рост распространенности таких хронических заболеваний как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания и некоторые формы рака [1].

Независимые исследования установили, что именно в детском и подростковом возрасте формируются основные факторы развития кардиоваскулярной патологии, реализация которых ухудшает прогноз заболевания, снижает качество жизни и социальную адаптацию. Ошибочным было мнение, что детей и подростков стоит относить к группе низкого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

До сих пор не установлены единые биохимические и гормональные маркеры поражения кардиоваскулярной системы в педиатрической практике у детей и подростков с избыточным накоплением жировой ткани. Данный факт делает необходимым выявить факторы сердечно-сосудистого риска у детей и подростков с избыточной массой тела [2].

В последние годы активно рассматривается кишечная микробиота как один из главных факторов, способствующих развитию ожирения. Исследования показали, что микробиота кишечника, регулируя массу тела, энергетический гомеостаз и процессы воспаления, играет важную роль в патофизиологии ожирения. Физиологические функции микробиоты распространяются намного дальше кишечника, оказывая влияние как на печень, так и на головной мозг и жировую ткань [3].

Жировая ткань является источником таких биологически активных молекул (адипокинов) как лептин и резистин, обладающих как системным, так и местным действием. Изменение концентрации данных адипокинов связывают с прогрессированием ожирения, с развитием инсулинорезистентности, дисфункции эндотелия и повышением артериального давления. Изучение биологически активных молекул жировой ткани позволяет по-новому оценить патогенез ожирения и связанных с ним сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета 2 типа [4]

Преобразование поступивших нутриентов, содержащих триметиламин, микробиотой является новым путем атерогенеза. В результате каскада биохимических реакций образуется проатерогенный маркер – триметиламин-N-оксида. В 2011 году была выявлена связь между ТМАО и риском сердечно-сосудистых катастроф [5,6].

Таким образом, актуальной задачей для современной медицины является разработка простых, неинвазивных и доступных методов диагностики ожирения и ассоциированных с ним сердечно-сосудистых осложнений. Решение этой задачи позволит еще на потенциально обратимой стадии проводить профилактические и лечебные мероприятия и улучшить прогноз основного заболевания, а также качество и продолжительность жизни пациента.

Цель исследования. Установить вклад клинико-лабораторных и метаболических факторов риска развития сердечно-сосудистых нарушений в формировании персонализированного подхода диагностики при ожирении у детей и подростков. Задачи: 1. Изучить клинико-лабораторные и метаболические показатели у детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением. 2. Исследовать уровень маркеров сердечно-сосудистых рисков (триметиламиноксид, показатели липидного спектра) и состав кишечной микробиоты у детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением. 3. Оценить гормональную активность жировой ткани у детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением.

Материал и методы. Настоящее исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. В качестве клинической базы использована ОГАУЗ «Детская больница №1». Подготовка и исследование образцов микробиоты кишечника проводились на базе Томского Политехнического Университета (научный парк ТПУ) и на базе Лаборатории Микробной Хроматографии (г. Санкт-Петербург). Биохимический и иммуноферментный анализы проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий д-р мед наук, профессор Е.В. Удуд) и на кафедре биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. В соответствии с поставленными задачами сформированы 2 группы детей и подростков. Основную группу составили 35 детей с избыточной массой тела и ожирением определенной в зависимости от SDS ИМТ согласно действующей классификации ВОЗ в возрасте 10-14 лет. Критерии включения: возраст от 10 до 15 лет, избыточный вес или ожирение, подписанное информационное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие клинически значимых неконтролируемых состояний или заболеваний, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на участие пациента в исследовании и/или проведении каких-либо процедур и интерпретации результатов в рамках исследования; отказ от участия в исследовании.

Контрольную группу составили 10 детей сопоставимых по полу и возрасту. Критерии включения: нормальная масса тела, подписанное информационное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие клинически значимых неконтролируемых состояний или заболеваний, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на участие пациента в исследовании и/или проведении каких-либо процедур и интерпретации результатов в рамках исследования; отказ от участия в исследовании.

Определение состава кишечной микробиоты проводилось по методу Осипова при помощи газовой хроматографии-масс спектрометрии. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Для определения уровня глюкозы и липидного спектра использовался автоматический биохимический анализатор ARCHITECT с8000. Определение концентрации ТМАО, лептина, иризина, резистина проводилось с использованием наборов компании Cloud-Clone Corp., методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Обследованы 45 подростков, результаты биохимического и гормонального исследований представлены в таблице 1. Исследование липидного спектра показало статистически значимое увеличение уровня триацилглицеридов – 1,1 (0,8; 1,7) ммоль/л в опытной группе по сравнению с контрольной - 0,9 (0,7; 1,0) ммоль/л.

Таблица 1. Основные биохимические и гормональные показатели.

	Основная группа n=35 Me (Q1:Q3)	Контроль n=10 Me (Q1:Q3)	p
Возраст	12,1 (10,8; 14,6)	13,1 (10,5; 13,8)	0,499
Вес	75,9 (63,6; 97,8)	45,0 (32,0; 55,2)	<0,001*
Рост	1,6 (1,49; 1,69)	1,5 (1,4; 1,6)	0,115
ИМТ	30 (27,3; 34,9)	18,7 (16,4; 20,9)	<0,001*
SDS ИМТ	2,9 (2,4; 3,4)	(-0,1 (-0,6; 0,5)	<0,001*
% избытка	43,5 (27,1; 59,2)	0 (0; 0)	<0,001*
GLP-2, пг/мл	102,95 (91,97; 149,15)	506,1 (385,5; 698,7)	<0,001*
GLP-1, пг/мл	20 (17,3; 24,0)	29,6 (24,9; 33,0)	<0,001*
Инсулин, мкЕд/мл	16,1 (10,2; 33,5)	5,7 (5,1; 7,9)	0,001*
С-пептид, нг/мл	1,8 (0,2; 2,6)	3,1 (1,6; 3,7)	0,021*
Глюкагон, пг/мл	174,3 (156,2; 200,1)	223,9 (210,3; 271,9)	<0,001*
ТМАО, пг/мл	265,4 (198,7; 374,0)	786,3 (618,6; 1242,8)	<0,001*
Глюкоза, ммоль/л	4,9 (4,3; 5,2)	5,1 (4,1; 5,3)	0,71
Ирисин, пг/мл	7,2 (6,9; 7,7)	7,3 (7,1; 7,5)	0,71
Лептин пг/мл	4,5 (2,2; 23,7)	19,0 (12,5; 25,7)	0,008*

Резистин нг/мл	8,8 (7,3; 26,7)	25,1 (24,4; 25,7)	0,019*
Общий холестерол, ммоль/л	4,4 (3,9; 5,0)	4,8 (3,9; 5,3)	0,415
ЛПВП, ммоль/л	1,1 (0,9; 1,6)	1,0 (0,9; 1,2)	0,326
ЛПНП, ммоль/л	2,9 (2,3; 3,4)	3,0 (2,2; 3,5)	0,989
ЛПОНП, ммоль/л	0,9 (0,49; 1,34)	0,6 (0,5; 0,8)	0,07
Индекс атерогенности	2,65 (1,98; 3,45)	2,9 (2,7; 3,1)	0,572
Триацилглицериды, ммоль/л	1,1 (0,8; 1,7)	0,9 (0,7; 1,0)	0,044*

Примечание: *-различия статистически значимы при уровне $p < 0,0$

В таблице 2 обозначены различия в составе микробиоты тонкого кишечника. В опытной группе отмечено повышение общей бактериальной нагрузки - 19146 (14549; 25514) кл/г*10⁵ в опытной и 12278,5 (10783,5; 14087) кл/г*10⁵ в контрольной. Отмечено повышение нагрузки резидентной микрофлоры - 19146 (14549; 25456) кл/г*10⁵ в опытной и 12241 (10783,5; 14087) кл/г*10⁵ в контрольной группе.

Таблица 2. Основные представители микробиоты кишечника биотопа «тонкая кишка» у детей с избыточной массой тела и ожирением, по сравнению со здоровыми детьми

Основные представители	Дети с избыточной массой тела и ожирением n=35 Me (Q1:Q3)	Дети с нормальной массой тела n=10 Me (Q1:Q3)	p-коэффициент достоверности
Общая бактериальная нагрузка (кл/г*10 ⁵)	19146 (14549; 25514)	12278,5 (10783,5; 14087)	<0,001*
Резидентные- нагрузка (кл/г*10 ⁵)	19146 (14549; 25456)	12241 (10783,5; 14087)	<0,001*
Резидентные от ОБН (%)	100 (100; 100)	100 (100; 100)	0,638
Транзиторные- нагрузка (кл/г*10 ⁵)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,861
Транзиторные от ОБН (%)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,638

Анаэробные бактерии-нагрузка (кл/г*10 ⁵)	17548 (13158; 22881)	11661,5 (10027,3; 13386)	0,001*
--	-----------------------------	---------------------------------	---------------

Анаэробные бактерии-от ОБН (%)	92 (90; 95)	95 (93,3; 95,3)	0,131
Микроскопические грибы (кл/г*10 ⁵)	2878 (1433; 4423)	3838 (2919,5; 5934,3)	0,093
Вирусы (кл/г*10 ⁵)	3879 (2410; 16200)	854,5 (653,8; 1178)	<0,001*

Примечание: *-различия статистически значимы при уровне $p < 0,05$

В таблице 3 показаны различия в составе микробиоты толстого кишечника. Показано снижение общей бактериальной нагрузки - 32457 (24319,5; 52388) кл/г*10⁵ в опытной и 59766,5 (48804,8; 78909) кл/г*10⁵ в контрольной группах. Также снижена нагрузки резидентной микрофлоры с 32223 (23981,5; 52373,5) кл/г*10⁵ в опытной до 59625 (47887; 78909) кл/г*10⁵ в контрольной до 32223 (23981,5; 52373,5) кл/г*10⁵ в опытной группе.

Таблица 3. Характеристика основных представителей микробиоты кишечника биотопа «просветная микробиота толстой кишки» у детей с избыточной массой тела и ожирением, по сравнению со здоровыми детьми

Наименование основных представителей микробиоты кишечника	Дети с избыточной массой тела и ожирением n=35 Me (Q1:Q3)	Дети с нормальной массой тела n=10 Me (Q1:Q3)	p-коэффициент достоверности
Общая бактериальная нагрузка (кл/г*10 ⁵)	32457 (24319,5; 52388)	59766,5 (48804,8; 78909)	0,01
Резидентные- нагрузка (кл/г*10 ⁵)	32223 (23981,5; 52373,5)	59625 (47887; 78909)	0,01
Резидентные от ОБН (%)	100 (99; 100)	100 (99; 100)	0,546
Транзиторные- нагрузка (кл/г*10 ⁵)	120 (0; 364)	221,5 (0; 260,3)	0,884
Транзиторные от ОБН (%)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0,546
Анаэробные бактерии-нагрузка (кл/г*10 ⁵)	30078 (22007; 47278,5)	57245,5 (43431,3; 76447,3)	0,009
Анаэробные бактерии-от	91 (87; 93)	95,5 (94; 97)	0,002

ОБН (%)			
Микроскопические грибы (кл/г*10 ⁵)	6143 (2148,5; 15355)	51180,5 (40447,5; 141306,3)	<0,001
Вирусы (кл/г*10 ⁵)	0 (0; 0)	0 (0; 437,8)	0,546

Примечание: *-различия статистически значимы при уровне $p < 0,05$

Результаты гормональных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты гормонального исследования.

Гормон	Основная группа (n=10) Me (Q1:Q3)	Контрольная группа (n=20) Me (Q1:Q3)
GLP-1 пг/мл	20 (18,0; 24,4)	31,1 (24,5;36,1) *
GLP-2 пг/мл	106,1 (90,3; 163,7)	736,7 (464,8; 881,2) *
Иризин нг/мл	7,3 (7,1; 7,5)	7,2 (6,9; 7,7)
Инсулин мкЕд/мл	16,1 (10,2; 33,5)	5,7 (5,1; 7,9) *
Глюкагон пг/мл	174,3 (156,2; 200,1)	223,9 (210,3; 271,9) *
Резистин пг/мл	25,1 (24,4; 25,7)	8,8 (7,3; 9,7) *
Лептин пг/мл	19,0 (12,5; 25,7)	4,5 (2,2; 5,7) *
ТМАО пг/мл	254,2 (198,7; 377,0)	893,3 (729,9; 1218,0) *

Примечание: *- $p < 0,05$.

Уровень GLP- 1 был ниже в основной группе и составлял 20 пг/мл (18,0; 24,4), в контрольной группе - 31,1 пг/мл (24,5; 36,1), $p=0,001$, GLP- 2 в основной группе 106,1 пг/мл (90,3; 163,7), в контрольной группе 736,7 пг/мл (464,8; 881,2), $p < 0,001$.

При этом уровень ТМАО у детей с ожирением оказался статистически значимо ниже - 254,2 (198,7; 377,0) пг/мл, чем в контрольной группе - 893,3 (729,9; 1218,0) пг/мл.

Уровень лептина статистически значимо повышен в основной группе 19,0 (12,5; 25,7) пг/мл по сравнению с контрольной – 4,5 (2,2; 5,7) пг/мл.

Уровень резистина статистически значимо выше в основной группе – 25,1 (24,4; 25,7) пг/мл, чем в контрольной – 8,8 (7,3; 9,7) пг/мл.

Уровень инсулина статистически значимо повышен в основной группе – 16,1 (10,2; 33,5) мкЕд/мл по сравнению с контрольной группой – 5,7 (5,1; 7,9) мкЕд/мл.

Уровень глюкагона статистически значимо снизился в опытной группе - 174,3 (156,2; 200,1) пг/мл по сравнению с контрольной - 223,9 (210,3; 271,9) пг/мл.

Уровень иризина статистически значимо не изменился - 7,3 (7,1; 7,5) пг/мл в основной группе, 7,2 (6,9; 7,7) пг/мл в контрольной.

Выводы. 1. Выявлено увеличение концентрации инсулина ($p=0,001$) у детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением 1-2 степени. 2. У детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением 1-2 степени отмечается снижение концентрации ТМАО, повышение триацилглицеролов, в тонком кишечнике увеличена общая бактериальная нагрузка, снижено видовое разнообразие (преобладал род Firmicutes), повышена вирусная нагрузка (Эпштейна-Барр, простой герпес), в микробиоте толстого кишечника отмечено снижение количества резидентной микрофлоры. 3. Обнаружен умеренный инкретиновый дефицит (снижение концентрации ГПП-1 и ГПП-2), снижение содержания глюкагона и резистина, повышение концентрации лептина.

Литература

1. Ожирение: современный взгляд на проблему [Text] / А.О. Разина, Е.Е. Ачкасов, С.Д. Руненко // Ожирение и метаболизм. — 2015. — Vol. 13, № 1. — P. 3–8.
2. Диагностика, лечение и профилактика ожирения у детей [Текст] / А. И.л // Смоленский медицинский альманах. — 2016. — № 3. — С. 184–191.
3. Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing [Text] / X. Chen, H. Sun, F. Jiang, Y. Shen, X. Li, X. Hu, X. Shen, P. Wei // PeerJ. — 2020. — Vol. 8. — P. e8317.
4. Adipose Tissue and Adipokines: The Association with and Application of Adipokines in Obesity [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/328592/> (дата обращения: 26.05.2021).
5. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target [Текст] / M.H. Janeiro, M.J. Ramírez, F.I. Milagro, J.A. Martínez, M. Solas // Nutrients. — 2018. — Т. 10, № 10.
6. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease [Text] / D. Fennema, I.R. Phillips, E.A. Shephard // Drug Metabolism and Disposition. — 2016. — Vol. 44, № 11. — P. 1839–1850.

Clinical, laboratory and biochemical aspects of the diagnosis of cardiovascular complications in obese children and adolescents

Y.G. Samoilova¹, O.A. Oleinik¹, E.V. Sagan¹, N.S. Denisov¹ *

¹*Siberian State Medical University, Department of Childhood Diseases
634050, Tomsk, Moscow tract 2*

* *Email: denisov.ssmu@gmail.com*

The aim of the study is to establish the contribution of clinical, laboratory and metabolic risk factors for the development of cardiovascular formations of a personalized approach to diagnostics in obesity in children and adolescents. Determination of the composition of the intestinal microbiota was carried out according to the Osipov method, hormonal studies were carried out by the ELISA method. According to the results of work in obese children, an increase in the concentration of insulin, triacylglycerols and leptin, a decrease in the concentration of TMAO, incretins, glucagon and resistin, in the small intestine, the total bacterial and viral load is increased, the species diversity is reduced, and a decrease in the microbiota of the large intestine is noted. the amount of resident microflora.

Key words: obesity, intestinal microbiota, trimethylamine oxide, glucagon-like peptide.

Инновационные разработки НВП «БашИнком» для защиты и питания растений

© В.С. Сергеев, Л.Ф. Миннебаев, Д.В. Гарифуллина

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-внедренческое предприятие «БашИнком»
450015, г. Уфа, улица Карла Маркса, 37.

Email: sergeev-vs@mail.ru

Представлены сведения об инновационных разработках НВП «БашИнком» для защиты и питания растений. Разработанные микробные препараты обеспечивают защиту растений от болезней и вредителей, повышают устойчивость растений к стресс-факторам внешней среды, позволяют улучшить минеральное питание, сохранить почвенное биоразнообразие, получать экологически чистую сельскохозяйственную продукцию.

Ключевые слова: биопрепараты и биоактивированные удобрения, полезные бактерии и грибы, эффективность.

Снизить пестицидную нагрузку на почву, растения, получить экологически чистую продукцию, при этом обеспечить рост урожайности сельскохозяйственных культур при снижении затрат – кредо НВП «БашИнком». Главными достоинствами биопрепаратов и биоактивированных удобрений, выпускаемых предприятием, являются их высокая эффективность, качество и безопасность для человека и животных. Высокий уровень разработок коллектива компании отмечен многочисленными наградами – 60 золотыми медалями, 200 дипломами и грамотами, полученными на российских и международных выставках.

НВП «БашИнком» отличается тем, что здесь разрабатываются, испытываются и регистрируются производимые биопрепараты и биоактивированные удобрения. Мощная научно-исследовательская база предприятия и тесное сотрудничество со многими НИИ и университетами позволяет проводить разработку новых, более эффективных препаратов и на их базе разрабатывать и внедрять современные биологизированные технологии возделывания сельскохозяйственных культур.

Особое место в линейке инновационных разработок занимают микробиологические препараты серии Фитоспорин. Суперновинка компании – это биофунгицид Фитоспорин-М, Ж (АС), который включает 3 основных вида полезных микроорганизмов – антагонистов фитопатогенов: *Bacillus subtilis* (сенная палочка), *Trichoderma reesei* и лизаты (метаболиты) бактерий рода *Pseudomonas: aureofaciens* и *fluorescens*. Еще одна сильная сторона биопрепарата Фитоспорин-М, Ж (АС) – входящий в его состав L-α-аминокислоты (аспарагиновая кислота, глицин, лизин и т. д.). Биопрепарат эффективно защищает растения от корневых гнилей, мучнистой росы, альтернариоза, фитофтороза, парши, ржавчины и других опасных заболеваний. Препарат начинает работать сразу после внесения и действует значительно дольше, чем химический фунгицид. В отличие от «химии», не вызывает формирования резистентности у фитопатогенов. Отличается высокой эффективностью даже в условиях низкой положительной температуры окружающей среды – от +4 градусов. Обладает высокой фунгицидной и бактери-

цидной активностью в сочетании с антистрессовыми, ростоускоряющими и иммуностимулирующими свойствами.

Еще одна разработка – новое микробиологическое органогуминовое удобрение Хозяин Плодородия с Кормилицей Микоризой. В состав нового препарата добавлена микориза, что многократно увеличивает возможности растения по улучшению питания, пищевого режима, влагозапасам и влагосбережению. Его можно без проблем вносить во время сева с помощью сеялок как припосевное удобрение, благодаря форме выпуска в виде гранул. Микориза, которая содержится в удобрении, способствует мощному развитию корневой системы, улучшает пищевой режим почвы и водообеспеченность растений.

БиоАзФК – микробиологическое удобрение для улучшения азотного, фосфорного и калийного питания с антистрессовыми, ростоускоряющими, иммуностимулирующими свойствами. В состав препарата входит целый консорциум живых микроорганизмов: азотфиксирующие бактерии *Azotobacter chroococcum*, фосформобилизующие бактерии *Bacillus megaterium*, фосфор- и калиймобилизующие бактерии *Bacillus mucilaginosus*, природные полисахариды, фитогормоны, витамины. Применение этого удобрения способствует укреплению иммунитета и повышению стрессоустойчивости растений, повышению урожайности и получению экологически чистой продукции, а также оздоровлению почвы в целом.

Микробиологический препарат для оздоровления почвы и разложения растительных остатков СТЕРНЯ-12, который содержит четыре штамма спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis*, три вида гриба *Trichoderma*, комплекс целлюлозолитических ферментов, а также природные полисахариды, фитогормоны и витамины. Препарат не только способствует оздоровлению почвы, но и обеззараживает пожнивные остатки зерновых, подсолнечника, кукурузы и других культур, оставшихся на полях после уборки. Кроме того, СТЕРНЯ-12 улучшает пищевой режим почвы, нейтрализует остатки химических пестицидов.

Разработан новый биологический прилипатель «Биолипостим», который по соотношению цена – качество превосходит отечественные и импортные химические прилипатели. В составе препарата – полисахариды растительного и микробиологического происхождения, которые растение воспринимает как свои. Препарат применяется для повышения эффективности средств защиты растений, регуляторов роста и водорастворимых удобрений при предпосевной обработке и в период вегетации сельхозкультур. Биолипостим совместим со всеми пестицидами, жидкими и водорастворимыми удобрениями, содержащими макро-, мезо- и микроэлементы в хелатной форме.

В числе других разработок «БашИнкома» следует отметить инокулянты серии Ризо-Баш. Препарат обладает высокой концентрацией азотфиксирующих клубеньковых бактерий, улучшает азотный режим почвы, снижает дозы внесения азотных удобрений, повышает урожайность и содержание протеина в урожае бобовых культур.

Завершается работа по регистрации биоинсектицидов ТуринБаш и Боверикс. В состав первого инсектицида входят штаммы бактерий *Bacillus thuringiensis*. Препарат применяется для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур: колорадским жуком (личинки 1–2-го возрастов), капустной молью, репной и капустной белянкой, огневкой (гусеницы 1–2-го возрастов), плодовой и яблонной молью (гусеницы 1–2-го возрастов) и др. Второй биоинсектицид на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*, который поражает широкий круг чешуекрылых, жесткокрылых, полужесткокрылых, прямокрылых и перепончатокрылых насекомых, а также некоторые виды клещей.

Внедрение в производство новых микробиологических разработок позволит стабилизировать агроценозы, повысить плодородие почвы и расширить возможности производства экологически чистых продуктов питания. Необходимость применения биопрепаратов понимают многие сельхозпроизводители, хотя перелома в понимании экологических проблем пока не наступило. Поэтому мы видим хорошие перспективы использования биопродукции в растениеводстве, которые, безусловно, будут расширяться вместе с ростом уровня сельскохозяйственного производства.

Метагеномный анализ структуры прокариотных сообществ горизонтов почв при No-Till технологии

© З.Ю. Сираева*, Е.А. Булыгина, Р.К. Исмагилова, О.А. Кравцова

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Россия, Республика Татарстан, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

*Email: zsiraeva@yandex.ru

Впервые в Республике Татарстан с помощью микробиологического и метагеномного анализа изучена структура прокариотных сообществ горизонтов почв при No-Till технологии.

Ключевые слова: No-Till технология, метагеномный анализ, микробиом, структура прокариотных сообществ почв.

На данный момент уровень плодородия почв во многом отличается от прошлых лет [1]. Сельскохозяйственные угодья, предназначенные для выращивания различных культур, подвергаются химическому воздействию в виде обработки пестицидами и внесения минеральных удобрений [2], что оказывает токсическое действие на бактериальное сообщество, являющееся основой биологической активности и, как следствие, плодородия почвы [3]. В связи с этим внимание многих исследователей и агропроизводителей обращено к No-Till технологии, известной как система нулевой обработки почвы, при которой механическому воздействию подвергается только поверхностный слой на уровне глубины посева [4].

Изучение бактериального сообщества почвы позволяет судить о биологическом разнообразии, плодородии почвы и сельскохозяйственной пригодности. Традиционным методом оценки относительного обилия таксонов является классический метод посева на питательные среды [5]. Однако методы микробиологии позволяют выявить лишь малую часть (от 1,5 до 5,0%) представителей бактериального сообщества [6]. Полно охарактеризовать прокариотное сообщество почвы возможно с помощью метагеномного анализа [6, 7].

В литературе имеются единичные данные о структуре микробного сообщества почвы, культивируемой по No-Till технологии [8]. Цель исследования – сравнительный микробиологический и метагеномный анализ прокариотных сообществ почвенных горизонтов при No-Till технологии.

В работе исследовали поле ООО «Тойма» Кукморского района Республики Татарстан, культивируемого по No-Till технологии с 2011 года. Типы почв: серая лесная глинистая (равнинный ландшафт), серая лесная тяжелосуглинистая (склон). Предшественник – горох посевной (*Pisum sativum* L.), сорт Усатый кормовой. Посевная культура – ячмень яровой (*Hordeum vulgare* L.), сорт НУР, РС-2. Образцы почвы отбирали после посева (25.05.2019) по [9] по генетическим горизонтам профиля из разреза глубиной 100 см.

Влажность почвы определяли согласно [10], рН солевой вытяжки – по [11], содержание гумуса – по [12], азота – по [13], подвижного фосфора и калия – по [14].

Для качественной оценки структуры прокариотного сообщества и учета представителей эколого-трофических групп микроорганизмов использовали метод посева серийных разведений на селективные среды [15] и метод почвенных комочков [16]. Родовую и видовую принадлежность бактерий определяли по [17-19].

Выделение ДНК из образцов проводили по стандартному протоколу [20]. Подготовку геномной библиотеки осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol (Illumina MiSeq). Качественную проверку библиотек производили на чипе Bioanalyzer DNA 1000 Chip, концентрацию ампликонов измеряли на приборе Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher, США). Секвенирование образцов проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно протоколу. Данные секвенирования анализировали с помощью программного обеспечения QIIME pipeline версия 1.9.1 [21], статистический анализ метагеномных данных – с помощью программы RStudio.

Известно, что структура прокариотного сообщества почвы определяется рядом факторов. В связи с этим построена картограмма поля, отображающая особенности рельефа (рисунок 1), проведен дифференциальный отбор образцов (рисунок 2) и агрохимический анализ (таблица 1).

Как видно из картограммы (рисунок 1), поле характеризуется рельефом смешанного типа: меньшая часть поля (23 га) – склоновая; большая (97 га) представляет собой равнинный возвышенный ландшафт.

Выявлены различия в агрохимическом фоне в зависимости от ландшафта: почва поля на склоновой части более кислая с пониженным содержанием подвижного фосфора и калия, но с более высоким содержанием азота и гумуса (таблица 1).

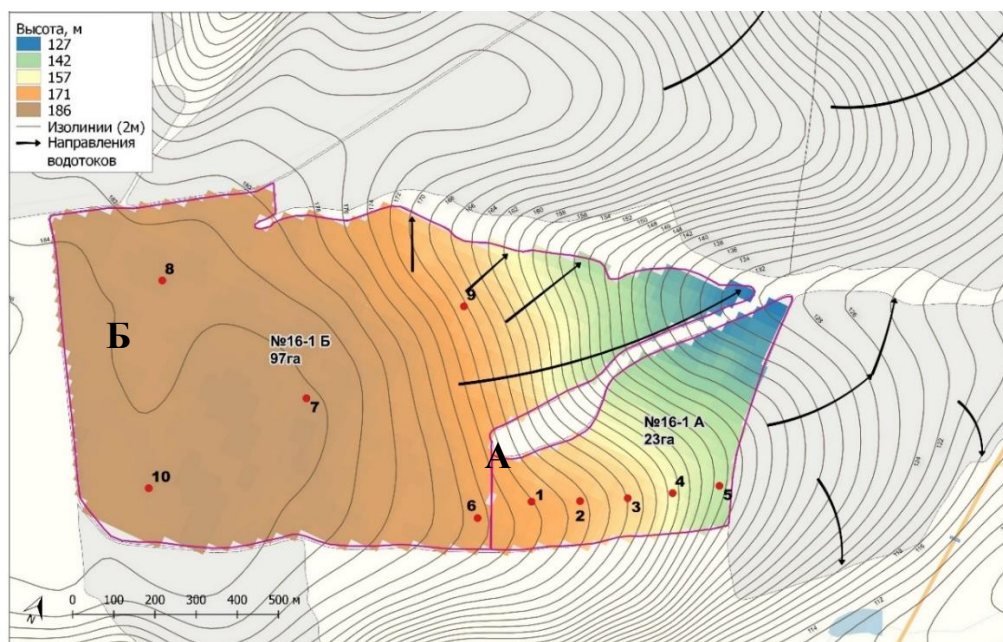


Рис. 1. Картограмма поля Кукморского района Республики Татарстан (А – склон; Б – равнинный возвышенный ландшафт).

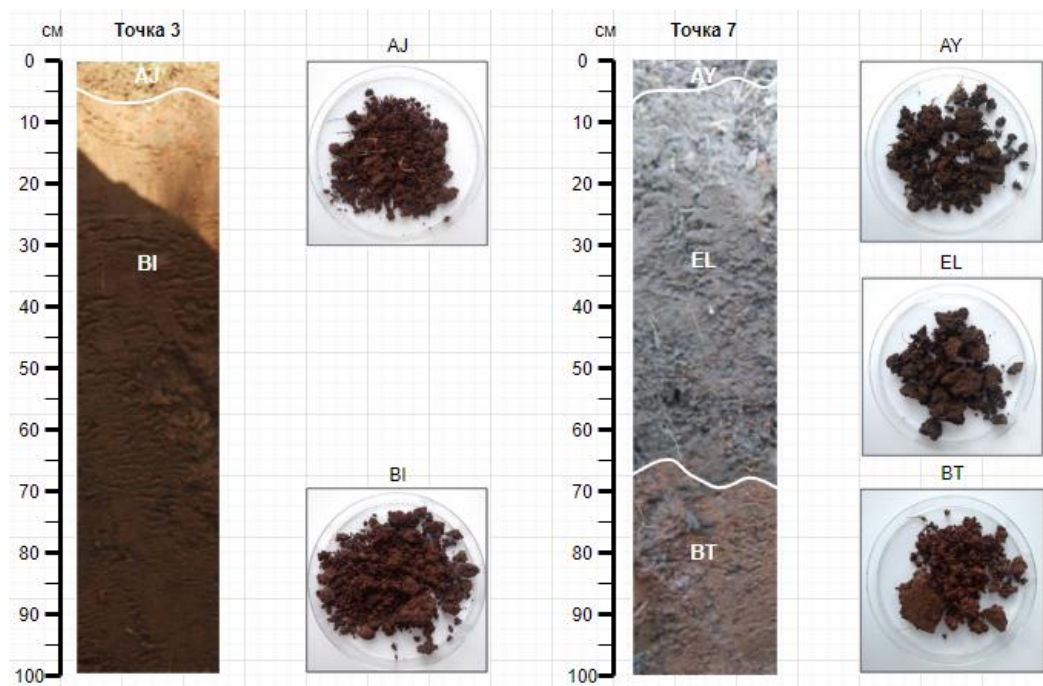


Рис. 2. Горизонты почв в точках 3 (AJ-BI) и 7 (AY-EL-BT).

Таблица 1. Агрохимические показатели почвы.

Показатель	Ландшафт	
	Точка 3 (склон)	Точка 7 (равнинный ландшафт)
pH	5,9±0,24	6,8±0,39
Подвижный фосфор, мг/кг	150,0±11	199,0±13
Подвижный калий, мг/кг	122,0±10	174,0±9
Органическое вещество, %	4,1±0,29	3,2±0,11
Щелочногидролизуемый азот, мг/кг	101,0±8	81,0±6

Традиционным методом оценки относительного обилия таксонов является классический метод посева на питательные среды. В то же время в качестве диагностического показателя почвенного плодородия рассматривают баланс в почве определенных физиологических групп микроорганизмов [1, 5]. Для оценки уровня плодородия почвы проведен анализ родового состава (таблица 2) и численности эколого-трофических групп микроорганизмов (таблица 3).

Таксономический состав почвенных образцов характеризуется большей представленностью типично сапротрофной почвенной микрофлоры из рода *Bacillus* и филума *Actinobacteria* (таблица 2). Численность аммонификаторов и бактерий, использующих минеральные формы азота, высокая – в диапазоне от $(1,1 \pm 0,09) \times 10^5$ до $(3,9 \pm 0,12) \times 10^6$ КОЕ/г абс. сух. почвы. С большей долей вероятности эти группы, вовлеченные в азот-

ный круговорот, представлены бактериями из родов *Bacillus* и *Pseudomonas* (таблица 2), способные выполнять функцию как аммонификаторов, так и нитрификаторов. Бактерии рода *Micrococcus*, численность которых снижалась по горизонтам, за исключением горизонта EL в точке 7 (таблица 2), являются деструкторами, разлагающими преимущественно безазотистое органическое вещество [5]. Вероятно, основной вклад в разложение органических остатков вносят представители рода *Micrococcus*, что коррелирует с постепенным снижением целлюлозоразрушающих бактерий по всему профилю (таблица 3).

Таблица 2. Родовой состав бактериального сообщества.

Род бактерий	Численность микроорганизмов, (M ± m) КОЕ/г асб. сух. почвы				
	точка 3 (склон)		точка 7 (равнинный ландшафт)		
	горизонт AJ	горизонт BI	горизонт AY	горизонт EL	горизонт BT
<i>Bacillus</i>	$(1,3 \pm 0,07) \times 10^5$	$(0,9 \pm 0,07) \times 10^5$	$(2,6 \pm 0,19) \times 10^5$	$(3,8 \pm 0,24) \times 10^4$	$(6,3 \pm 0,23) \times 10^4$
<i>Pseudomonas</i>	$(1,8 \pm 0,04) \times 10^3$	$(6,5 \pm 0,27) \times 10^3$	$(5,3 \pm 0,27) \times 10^3$	$(5,3 \pm 0,27) \times 10^3$	$(2,3 \pm 0,22) \times 10^3$
<i>Flavobacterium</i>	$(2,4 \pm 0,04) \times 10^3$	$(1,9 \pm 0,13) \times 10^3$	$(1,8 \pm 0,11) \times 10^2$	$(2,8 \pm 0,16) \times 10^2$	$(1,9 \pm 0,17) \times 10^2$
рода филума <i>Actinobacteria</i>	$(9,2 \pm 0,14) \times 10^4$	$(2,2 \pm 0,11) \times 10^6$	$(3,3 \pm 0,17) \times 10^5$	$(3,8 \pm 0,11) \times 10^6$	$(4,7 \pm 0,12) \times 10^4$
в том числе, <i>Micrococcus</i>	$(3,1 \pm 0,02) \times 10^4$	$(4,3 \pm 0,31) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,09) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,09) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^3$
Неидентифицированные	$(8,0 \pm 0,11) \times 10^5$	$(0,9 \pm 0,11) \times 10^5$	$(3,2 \pm 0,22) \times 10^5$	$(1,4 \pm 0,19) \times 10^5$	$(1,4 \pm 0,15) \times 10^5$

Примечание: M ± m – среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

Таблица 3. Численность эколого-трофических групп микроорганизмов.

Эколого-трофическая группа	Численность микроорганизмов, (M ± m) КОЕ/г асб. сух. почвы				
	точка 3 (склон)		точка 7 (равнинный ландшафт)		
	горизонт AJ	горизонт BI	горизонт AY	горизонт EL	горизонт BT
Аммонифицирующие	$(1,1 \pm 0,09) \times 10^5$	$(3,9 \pm 0,12) \times 10^6$	$(9,7 \pm 0,20) \times 10^4$	$(4,8 \pm 0,21) \times 10^5$	$(3,2 \pm 0,19) \times 10^5$
Денитрифицирующие	$(2,7 \pm 0,06) \times 10^4$	$(6,7 \pm 0,23) \times 10^3$	$(1,0 \pm 0,09) \times 10^4$	$(2,8 \pm 0,12) \times 10^4$	$(4,0 \pm 0,09) \times 10^2$
Использующие минеральные формы азота	$(8,9 \pm 0,02) \times 10^5$	$(4,1 \pm 0,27) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,05) \times 10^6$	$(4,7 \pm 0,16) \times 10^6$	$(1,0 \pm 0,08) \times 10^4$

Аэробные азот-фиксирующие	$(2,8 \pm 0,12) \times 10^2$	$(2,1 \pm 0,12) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,04) \times 10^2$	$(1,6 \pm 0,18) \times 10^3$	$(1,1 \pm 0,16) \times 10^3$
Фосфатрастворяющие	$(5,4 \pm 0,07) \times 10^3$	$(3,5 \pm 0,07) \times 10^3$	$(2,2 \pm 0,10) \times 10^2$	$(1,0 \pm 0,10) \times 10^2$	$(1,1 \pm 0,07) \times 10^2$
Целлюлозоразрушающие, %	52±4,0	21±1,4	48±1,9	29±1,4	17±0,6
<i>Azotobacter</i> , %	13±1,1	22±1,2	29±1,7	32±1,4	8±0,5

Примечание: $M \pm m$ – среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Численность актинобактерий варьировала от $4,7 \pm 0,12 \times 10^4$ до $3,8 \pm 0,11 \times 10^6$ КОЕ/г абс. сух. почвы (таблица 2). Выявленное превышение содержания актинобактерий в равнинной части поля над склоновой (таблица 2) обусловлены, вероятно, оптимальной для актинобактерий (нейтральной) средой почвенной вытяжки (таблица 1).

Общепринято, что почвы характеризуются пятью степенями обогащенности [22]. Согласно шкале обогащенности, исследуемая почва по численности бактерий относится к группе богатых почв.

По результатам метагеномного анализа, в микробиоме горизонтов доминируют филумы *Actinobacteria* (36-56%) и *Proteobacteria* (31-43%), в меньшей степени (ниже 5,0%) присутствуют представители филумов *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes* (рисунок 3).

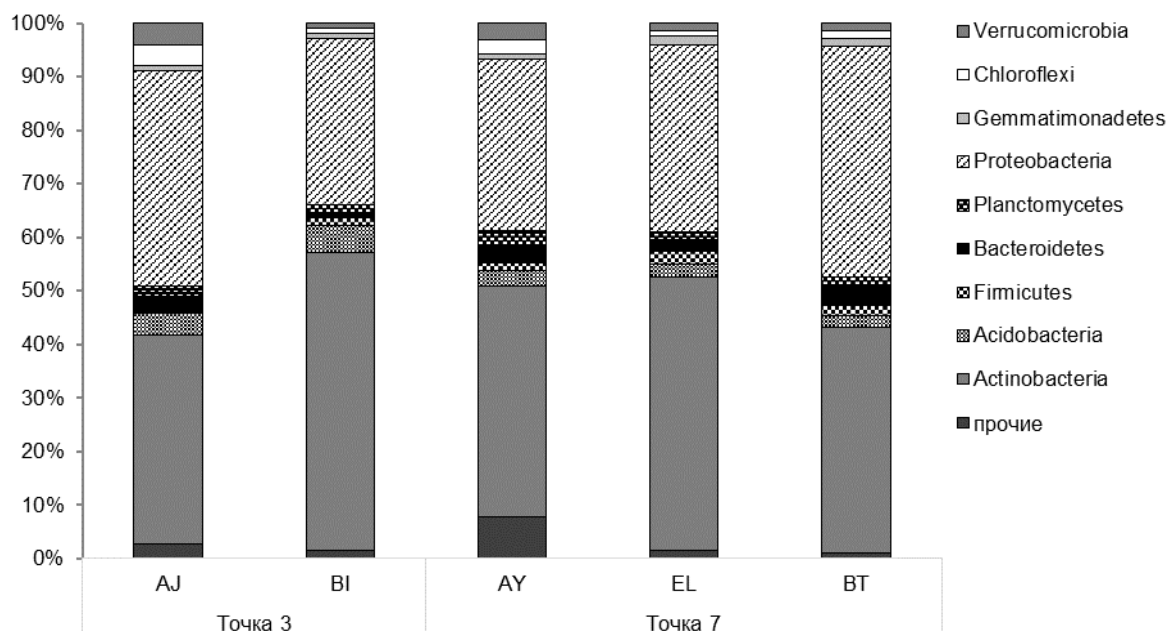


Рис. 3. Таксономическая структура бактериальных сообществ почвенных горизонтов.

Экологические особенности микробиома коррелируют с результатами агрохимического и микробиологического анализов и данными литературы. Так, в частности, присутствие

ацидобактерий (рисунок 3) обусловлены пониженными значениями pH почвенной вытяжки (таблица 1), что также отмечено исследователями [23, 24]. Доминирование в структуре прокариот представителей филумов *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (рисунок 3) подтверждено методом посева на питательные среды (таблицы 2, 3).

Таким образом, установлено, что почва поля относится к группе богатых почв, по содержанию актинобактерий – к почве с высоким уровнем супрессивности. Независимо от рельефа, численность актинобактерий в нижних горизонтах превышает численность в верхних слоях, а численность бацилл и других сапрофитных бактерий, напротив, понижается с увеличением глубины залегания почвенных слоев. Численность бактерий, использующих минеральные формы азота, и актинобактерий выше на равнинном ландшафте, нежели на склоновом, свободных азотфиксаторов и аммонификаторов – на склоновом. Совокупность полученных результатов подтверждает сопоставимость данных о структуре микробных сообществ почвенных горизонтов, полученных методами микробиологии и метагеномного анализа.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Литература

1. De Santiago A., Recena R., Perea-Torres F., Moreno M. T., Carmona E., Delgado A. Relationship of soil fertility to biochemical properties under agricultural practices aimed at controlling land degradation // *Land Degradation and Development*. 2019. Vol. 30. P. 1121-1129.
2. Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture // *Frontiers in Public Health*. 2016. Vol. 4. P. 1-8.
3. Prashar P., Shah S. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture // *Sustainable Agriculture Reviews*. 2016. Vol. 19. P. 331-361.
4. Gattinger A., Jawtusich J., Muller A., Mäder P. No-till agriculture – a climate smart solution? // *Bischofliches Hilfswerk MISEREOR*. 2011. Vol. 2. P. 1-24.
5. Добровольская Т. Г. Структура бактериальных сообществ почв / М.: Академкнига, 2002. 258 с.
6. Семенов М. В. Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // *Журнал общей биологии*. 2019. Т. 80. С. 403-417.
7. Pookhao N., Sohn M. B., Li Q., Jenkins I., Du R., Jiang H., An L. A two-stage statistical procedure for feature selection and comparison in functional analysis of metagenomes // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 31. P. 158-165.
8. Tyler H. L. Bacterial community composition under long-term reduced tillage and no-till management // *Journal of Applied Microbiology*. 2019. Vol. 126. P. 1797-1807.
9. ГОСТ 17.4.4.02-2017. Охрана природы (ССОП). Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартинформ, 2018. 9 с.

10. ГОСТ 28268-89. Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений. М.: Стандартинформ. 2006. 8 с.
11. ГОСТ 26483-85. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО. М.: Изд-во стандартов, 1985. 6 с.
12. ГОСТ 26213-91. Почвы. Методы определения органического вещества. М.: Изд-во стандартов, 1992. 8 с.
13. ГОСТ Р 58596-2019. Методы определения общего азота. М.: Стандартинформ, 2018. 7 с.
14. ГОСТ 26204-91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Чирикова в модификации ЦИНАО. М.: Изд-во стандартов, 1992. 8 с.
15. Семина Н. А., Сидоренко С. В., Резван С. П., Грудинина С. А., Страчунский Л. С., Стецюк О. У., Козлов Р. С., Эйдельштейн М. В., Ведьмина Е. А., Столярова Л. Г., Власова И. В., СерEDA З. С. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 92 с.
16. Казеев К. Ш., Даденко Е. В., Колесников С. И., Акименко Ю. В. Методы биодиагностики наземных экосистем / Ростов-на-Дону: ФГАОУВО ЮФУ, 2016. 357 с. ISBN 978-5-9275-2214-9.
17. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. V. 2. New York: Springer., 2005. 2811 p. ISBN: 978-0-387-95040-2.
18. Vos P., Garrity G.M., Jones G., Krieg D., Ludwig N.R., Rainey W., Schleifer F.A., Whitman K.-H. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. V. 3. New York: Springer., 2009. 1450 p. ISBN: 978-0-387-68489-5.
19. Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K.-I., Parte A. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. V. 5. New York: Springer., 2012. 2083 p. ISBN 978-0-387-68233-4.
20. Fatima F., Chaudhary I., Ali J., Rastogi S., Pathak N. Microbial DNA extraction from soil by different methods and its PCR amplification // *Biochem. Cell. Arch.* 2011. Vol. 11. P. 85-90.
21. Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods*. 2010. Vol. 7. P. 335-336.
22. Звягинцев Д. Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей // *Почвоведение*. 1978. № 6. С. 44-54.
23. Pajares S., Bohannan B. J. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils // *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. P. 1-20.
24. Dai Z., Su W., Chen H., Barberán A., Zhao H., Yu M., Yu L., Brookes P. C., Schadt C. W., Chang S. X., Xu J. Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and fa-

vors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe // Global Change Biology. 2018. Vol. 24. P. 3452-3461.

Metagenomic analysis of the structure of prokaryotic communities of soil horizons at No-Till technology

Z. Yu. Siraeva*, E. A. Bulygina, R. K. Ismagilova, O. A. Kravzova

*Kazan (Volga Region) Federal University
18 Kremlyovskaya Street, 420008 Kazan, Tatarstan Republic, Russia*

**Email: zsiraeva@yandex.ru*

For the first time in the Tatarstan Republic the structure of prokaryotic communities of soil horizons at No-Till technology was studied.

Keywords: No-Till technology, metagenomic analysis, microbiome, structure of the prokaryotic soil community.

Влияние нефтяного загрязнения на всхожесть и морфометрические показатели растений семейства *Fabaceae*

© Ю.М. Сотникова*, Р.Г. Фархутдинов

Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32

*Email: sotnikova-bashedu@mail.ru

На сегодняшний день загрязнение нефтью и нефтепродуктами является одной из основных проблем в биологии. Фиторемедиация считается одним из перспективных методов восстановления земель, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Все большую актуальность приобретает поиск растений, обладающих способностью к фиторемедиации нефтезагрязненных земель.

Ключевые слова: люцерна посевная, фиторемедиация, нефтяное загрязнение

Главное требование, предъявляемое к растениям-фиторемедиантам – это высокая адаптивная устойчивость к действию загрязнителя [1]. Растения-фиторемедианты также должны обладать высокой скоростью накопления биомассы, способностью поглощать и накапливать тяжелые металлы и другие ксенобиотики, а также активизировать деятельность почвенных микроорганизмов [2,3,4]. Продолжаются поиски растений, пригодных для фиторемедиации, предполагающей извлечение поллютантов из загрязненных почв корневой системой растений с последующим их переносом и аккумуляцией в надземной части растений [5,6]. Множество исследований посвящено поиску растений, обладающих устойчивостью к нефтяному загрязнению, в связи с чем, целью данной работы явилась оценка устойчивости к нефтяному загрязнению растений семейства Бобовые (*Fabaceae*).

Материалы и методы. Объектами исследования были растения семейства Бобовые (*Fabaceae*) (люцерна посевная (*Medicago sativa* L.), клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), донник желтый (*Melilotus officinalis* L.), вика посевная (*Vicia sativa* L.)).

Для оценки всхожести семян в условиях нефтяного загрязнения в чашки Петри помещали по 100 г почвы, вносили нефть в концентрациях 1%, 3%, 4%, 6% и 8% от сухой массы почвы. В качестве контроля использовали незагрязненную почву. Через 3 суток в почву вносили семена исследуемых растений в соответствии с нормами высева для каждой культуры [7]. Оценку результатов проводили через 7 суток. Отмечали количество проросших семян в опытном и контрольном варианте.

После определения фитотоксичности почвы проводили оценку устойчивости растений к условиям длительного нефтяного загрязнения. Растения выращивали на серой лесной почве в сосудах объемом 0,5 л. Вносили нефть в концентрациях 1%, 3%, 4%, 6% и 8% от сухой массы почвы. Почву увлажняли и поддерживали на протяжении всего периода выращивания. Через 3 суток в почву вносили семена исследуемых растений в соответствии с рекомендациями для каждой культуры [7]. В контрольном варианте эксперимента растения выращивали без внесения нефти. Сравнительную оценку устойчивости проводили через 30 суток.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и доверительный интервал при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Была проведена оценка способности семян к всхожести в условиях нефтяного загрязнения (табл. 1).

Как видно из табл. 1 всхожесть семян на незагрязненной почве у представителей семейства Бобовые (*Fabaceae*) - люцерны, клевера, донника составляла более 90%, а у вики была ниже 90%.

Таблица 1. Влияние уровня нефтяного загрязнения почвы на всхожесть семян растений разных видов, %

	Люцерна	Клевер	Донник	Вика
Контроль	96±2	93±1	93±1	86±7
Нефть 1%	88±1	84±3	82±1	82±8
Нефть 3%	82±1	74±3	71±4	68±8
Нефть 4%	78±4	67±3	57±6	29±8
Нефть 6%	62±3	60±6	34±4	16±1
Нефть 8%	53±4	51±4	14±1	11±1

Примечание: представлены средние значения и их стандартные ошибки; отличия от контрольных образцов при $P \leq 0,05$.

В случае загрязнения при концентрации 1% и 3%, значительного снижения всхожести семян у бобовых, за исключением вики, по сравнению с контрольными образцами не наблюдалось (табл. 1), что указывает на низкий фитотоксический эффект данных концентраций. При концентрациях нефти 6% и 8% было выявлено значительное ингибирующее действие на все исследуемые виды растений и всхожесть семян варьировала от 11% (вика) до 53% (люцерна). Таким образом, при содержании нефти в почве в концентрации 4% и ниже, не наблюдалось значительного фитотоксического действия на всхожесть семян исследуемых растений семейства Бобовых. Наименьший токсический эффект нефтяного загрязнения на всхожесть семян был установлен у семян люцерны.

Оценка влияния длительного выращивания растений в присутствии нефти на морфометрические показатели растений семейства Бобовые показала, что при загрязнении почвы 1% нефтью, средние значения показателей практически не отличались от контрольных значений, но при повышении концентрации загрязнителя до 6% и 8% средняя длина проростков значительно уменьшалась (табл. 2). Растения люцерны, при внесении 4% объема нефти в почву, снижали скорость ростовых процессов в меньшей степени по сравнению с другими растениями (табл. 2). Рост корней также снижался: в наименьшей степени у люцерны (на 28%), и более значительно у остальных культур (клевер, донник, вика) соответственно, на 40, 30 и 60% (табл. 2).

Таблица 2. Влияние нефтяного загрязнения почвы на длину побега (П) и корня (К) растений разных видов, см

		Люцерна	Клевер	Донник	Вика
Контроль	П	3,2±0,02	2,7±0,03	2,8±0,04	2,3±0,04
	К	3,5 ±0,01	3,7±0,01	3,0±0,04	2,3±0,02
Нефть 1%	П	3,1±0,04	2,6±0,03	2,7±0,03	2,0±0,02
	К	3,1±0,04	3,1±0,04	2,8±0,04	2,0±0,02
Нефть 3%	П	2,9±0,04	2,2±0,02	2,6±0,03	1,5±0,02
	К	2,7±0,03	2,7±0,03	2,5±0,03	1,5±0,02
Нефть 4%	П	2,7±0,03	2,1±0,02	2,1±0,02	0,9±0,01
	К	2,5±0,03	2,2±0,02	2,1±0,02	1,1±0,01
Нефть 6%	П	2,0±0,02	1,1±0,01	1,1±0,01	0,5±0,01
	К	1,9±0,01	2,0±0,03	1,8±0,02	0,7±0,01
Нефть 8%	П	1,7±0,01	0,9±0,01	0,6±0,01	0,3±0,01
	К	1,7±0,01	1,5±0,01	1,3±0,01	0,3±0,01

Примечание: представлены средние значения и их стандартные ошибки; отличия от контрольных образцов при $P \leq 0,05$.

Таким образом, в ходе оценки влияния нефтяного загрязнения на всхожесть и морфометрические показатели растений семейства Бобовые было установлено, что наиболее устойчивы проростки люцерны посевной. Наиболее «оптимальный» для сохранения всхожести семян и роста исследуемых растений объем нефтяного загрязнения – 4%.

Относительно устойчивая всхожесть семян и рост проростков растений семейства Бобовые были установлены у люцерны посевной в опытах с 4% содержанием нефти в почве, поэтому эти растения могут быть рекомендованы для фиторемедиации земель подвергнутых нефтяному загрязнению.

Литература

1. Панченко, Л.В. Атлас растений-фиторемедиантов /Л.В.Панченко, А.Ю.Муратова, Е.В.Дубровская, С.Н.Голубев, М.А.Березуцкий, О.В. Турковская. – Саратов: Научная книга, 2015. – 560 с.

2. Башмаков, Д.И. Аккумуляция тяжелых металлов некоторыми высшими растениями в разных условиях местообитания /Д.И.Башмаков, А.С. Лукаткин. –Агрохимия, 2002. - № 9. - С. 66-71.
3. Тафеева, Е.А. Содержание тяжелых металлов и нефтепродуктов в почве на территории нефтедобывающих районов Республики Татарстан / Е.А. Тафеева, А.В.Иванов, А.А.Титова, И.В. Петров. -Гигиена и санитария, 2016. - 95(10). – С. 939-941. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2016-95-10-939-941>
4. Prabha, J. Opportunities and challenges of utilizing energy crops in phytoremediation of environmental pollutants / J. Prabha, M. Kumar, R. Tripathi. - Bioremediation for Environmental Sustainability, 2021. - Elsevier. - Chapter 17. -P.383-396.
5. Киреева, Н.А. Подбор растений для фиторемедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, В.В.Водопьянов, А.Р. Амирова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2011. - Т. 13. - № 5(2). - С. 184-187.
6. Trakal, L. Phytoextraction of Metals: Modeling Root Metal Uptake and Associated Processes/ L. Trakal, D. Martínez-Fernández, M. Vítková, M. Komárek. – Phytoremediation Management of Environmental Contaminants, 2015. -V. 1. -P. 69-86.
7. Фирсов, И.П. Технология производства продукции растениеводства / И.П. Фирсов, А.М. Соловьев, М.Ф. Трифонова. – М.: КолосС, 2006. – 472 с.

Влияние высоких концентраций CoCl_2 , Co(II) - и Co(III) ЭДТА на редокс-метаболизм и дыхание растений пшеницы

© Г.И. Хаматдинова¹, К.М. Сигова¹, В.В. Федяев^{1,2}, М.И. Гарипова¹, Р.Г. Фархутдинов¹

¹Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²Уфимский Институт биологии Российской академии наук
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 69.

*Email: vadim.fedyayev@gmail.com

ЭДТА-комплексы кобальта (Co) оказывали меньше токсического воздействия на рост, редокс-метаболизм и дыхание растений пшеницы Казахстанская 10 по сравнению с CoCl_2 .

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, кобальт, токсичность, антиоксидантная система.

Кобальт (Co) в высоких концентрациях оказывает токсическое влияние на большинство видов растений. Негативные эффекты Co и его соединений в основном зависят от физико-химических свойств образующих с кобальтом комплексов [1,3]. Co в составе ЭДТА-комплексов может находиться в двух степенях окисления – II и III. По литературным данным, Co(III) ЭДТА токсичен и термодинамически более стабилен по сравнению с Co(II) ЭДТА [8]. В настоящее время мало данных о фитотоксическом воздействии Co. Исследование фитотоксичности Co, для таких растений как ячмень, масличный рапс и томаты, выявило его негативное влияние на рост и биомассу побегов [1,3]. Помимо воздействия на биомассу, высокие концентрации Co снижают водный потенциал и скорость транспирации у растений [5]; нарушают фотосинтез, ингибируя синтез пигмента хлорофилла [4]; приводят к повышению активности антиоксидантных ферментов, что указывает на индукцию окислительного стресса [9]. Цитотоксичность, вызываемая у растений повышенными уровнями Co, включает ингибирование митоза и повреждение хромосом, нарушение эндоплазматического ретикулаума и дезорганизацию флоэмы в кончиках корней [1].

Одним из основных эффектов повреждающего действия тяжелых металлов для растений является повышение содержания активных форм кислорода (АФК), что приводит к окислительному стрессу. Результатом этого процесса является разрушение мембран, утечка ионов, перекисное окисление липидов и расщеплению цепей ДНК [6]. Защитные механизмы, позволяющие растениям преобразовывать АФК в менее токсичные продукты, включают повышение уровней метаболических промежуточных соединений и антиоксидантных ферментов [2,7].

Целью нашей работы было определение влияния высоких концентраций соединений кобальта на состояние про-/антиоксидантной системы растений пшеницы.

В качестве материалов исследования были использованы растения пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 10. Для получения проростков семена стерилизовали раствором гипохлорита натрия (использовался 5 %-й раствор коммерческого отбеливателя «Белизна»). Растения пшеницы выращивали методом гидропоники при освещении.

щении. Соединения кобальта (CoCl_2 , Co(II)ЭДТА и Co(III)ЭДТА) в концентрации 250 мкМ вносили в питательный раствор Хогланда-Арнона без добавления источника железа и микроэлементов. Измерения необходимых параметров проводили на 10-суточных растениях. Co(II)ЭДТА получали добавлением равного молярного (0,5 М) количества растворов CoCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$ и ЭДТА. Co(III)ЭДТА синтезировали по методу Taylor и Jardine [8]. Определение морфометрических (сырая и сухая масса, длина корней и побегов) и биохимических показателей, оценка активности ферментов пшеницы под влиянием высоких концентраций соединений кобальта было проведено ранее описанными методами [10].

Повышенная концентрация CoCl_2 вызывала снижение ростовых параметров у растений пшеницы. В то же время ЭДТА-комплексы с той же концентрацией Co , оказывали меньше повреждающего действия на сухую массу и длину корней и побегов.

Под воздействием CoCl_2 увеличивалось содержание супероксид-аниона и пероксида водорода, в то же время активность супероксиддисмутазы, гваяколпероксидазы и каталазы уменьшалась. Под воздействием Co(III)ЭДТА на корни растений наблюдалось высокое содержание АФК и низкая активность вышеперечисленных ферментов. Co(II)ЭДТА оказывал на растения меньшее токсического воздействия, чем Co(III)ЭДТА .

Измерение скорости дыхания у корней и побегов растений показало усиление потребления кислорода под влиянием CoCl_2 , по сравнению с контрольной группой растений. В присутствии ЭДТА-комплексов кобальта изменение данного параметра наблюдалось в меньшей степени.

Таким образом, определение морфометрических и биохимических параметров позволяет оценить степень токсичности минеральной и ЭДТА-комплексов кобальта на растения пшеницы Казахстанская 10. Показано снижение токсичности кобальта в ряду CoCl_2 , Co(III) - и Co(II)ЭДТА , а также различие реакции растений на воздействие этих комплексов.

Литература

1. Akeel A., Jahan A. Role of cobalt in plants: its stress and alleviation // Contaminants in agriculture. Cham: Springer. 2020. P. 339-357.
2. He J. et al. Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus× canescens* // *Physiologia Plantarum*. 2011. V. 143. №. 1. P. 50-63.
3. Li H.F., Gray C. et al. Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils // *Chemosphere*. 2009. V. 75. P. 979–986.
4. Mysliwa-Kurdziel B., Prasad M. N. V., Strzałka K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants // *Heavy metal stress in plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2004. P. 146-181.
5. Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // *Environmental chemistry letters*. 2010. V. 8. P. 199-216.
6. Shahid M. et al. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 232. 2014. P. 1-44.

7. Tang K. et al. Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings // *Journal of plant physiology*. 2010. V. 167. №. 2. P. 95-102.
8. Taylor D.L., Jardine P.M. Analysis of cobalt (II) EDTA and cobalt (III) EDTA in pore water by ion chromatography // *Journal of Environmental Quality*. 1995. V. 24. P. 789-792.
9. Tewari R. K. et al. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt // *Plant Science*. 2002. V. 162. P. 381-388.
10. Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Массалимов И.А., и др // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018. Т. 8, N 2. С. 55–62.

Effect of high concentrations of CoCl₂, Co (II) - and Co (III) EDTA on redox metabolism and respiration of wheat plants

G.I. Khamatdinova¹, K.M. Sigova¹, V.V. Fedyaev^{1,2}, M.I. Garipova¹, R.G. Farkhutdinov¹

¹*Bashkir State University*

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

²*Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences*

69 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: vadim.fedyaev@gmail.com*

EDTA complexes of cobalt (Co) had less toxic effect on the growth, redox metabolism, and respiration of Kazakhstanskaya 10 wheat plants compared to CoCl₂.

Keywords: *Triticum aestivum*, cobalt, toxicity, antioxidant system.

Применение ISSR-маркеров для выявления и оценки генетической дифференциации популяций липы мелколистной на территории Республики Башкортостан

© Р.Р. Хисамова¹, Х.Г. Мусин², Р.Г. Фархутдинов¹

¹Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

Email: r.hisamova@mail.ru, frg2@mail.ru

Для выявления генетического полиморфизма были использованы маркеры ISSR16 и ISSR17, которые помогли в определенной степени установить генетическое родство липовых насаждений из разных природных зон, а также генетические различия.

Ключевые слова: популяции, липа, полиморфизм, СТАБ-метод выделения ДНК, дендрограмма.

На территории Республики Башкортостан произрастает большое количество многообразных растений. Это связано напрямую с разнообразием климатических зон за счет высотной поясности и широтной зональности [7, 11, 12]. В настоящее время систематика дикорастущих растений в Российской Федерации в большей степени основывается на классических методах ботаники. В то же время генетические методы исследования в нашей республике используются нечасто. Следовательно, исследования с использованием молекулярно-генетических маркеров, в частности, генетического полиморфизма видов, и также популяций, в нашей республике считается актуальным [10].

Так как для липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) исследования только на начальном пути своего развития, на сегодняшний день большой интерес представляет генетический анализ популяций липы для того, чтобы в дальнейшем оценить гетерогенность генетического характера и разграничения возможных отдельных популяций. В настоящее время для выявления полиморфизма липы мелколистной ДНК прежде всего могут применяться методы, которые основаны на ПЦР для одновременного выявления мультилокусного полиморфизма ДНК. В этом случае знания нуклеотидных последовательностей всего генома или его частей не считаются необходимыми.

Целью данной работы было проведение молекулярно-генетических исследований для выявления особенностей генетического полиморфизма популяций липы мелколистной произрастающих в разных природных зонах Республики Башкортостан с использованием ISSR-маркеров.

Материалы и методы. Исследования и сбор материала проводились в период лета (июль-август) 2019 и 2020 годов на территории Республики Башкортостан. Для выделения ДНК использовали СТАВ – метод [1], в модификации д.б.н. Кулуева Б.Р. [10].

Исследования генетической дифференциации *T. cordata* было проведено на основе анализа полиморфизма ДНК с помощью микросателлитного маркера с полилокусным

доминантным типом наследования – Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Для ISSR анализа нами были выбраны два праймера ISSR 16 и ISSR 17. Выбор праймеров был обусловлен тем, что именно они по данным ряда авторов показали высокую полиморфность локусов по отношению к другим исследованным объектам [2, 3]. Нуклеотидная последовательность данных праймеров следующая:

ISSR16 GAGAGAGAGAGAGAGAC
 ISSR17 GAGAGAGAGAGAGAYC

Для ISSR-PCR анализа применяли стандартную методику [6]. Для фракционирования выделенного тотального ДНК и анализа размера ампликонов после ПЦР использовали 1% агарозный гель. Для его приготовления с расчетом на 100 мл взвесили 1 % агарозы (Le 2 agarose, Russia), прилили 2000 мкл TAE 50x буфера и довели до 100 мл дистиллированной водой. ПЦР–продукт наносили в гель в количестве 7,5 мкл, вместе с 2,5 мкл загущающего красителя состава бромфеноловый синий+ксиленцианол.

Анализы проводили в однократном трис-ацетатном (TAE) буфере. Реактивы для одного литра однократного TAE буфера следующие: TAE 50x – 20 мл, дистиллированная вода – 980 мл. После окончания электрофореза гель выдерживали в растворе бромистого этидия в течение 8 минут. Приблизительную оценку качества выделенного продукта проводили по интенсивности флуоресценции в УФ-свете [9].

При построении дендрограмм применили метод UPGMA с использованием программы TREECON [5].

Результаты. В наших исследованиях использовались гербарные образцы листьев липы. Сбор растительного материала был произведен с 26 липовых насаждений на территории Республики Башкортостан (табл. 1).

Таблица 1. Места сбора образцов *Tilia cordata* Mill. для анализа.

№ образца	Место сбора
1.	Альшеевский район. Село санатория им. Чехова.
2.	Давлекановский район. Озеро Аслыкуль.
3.	Гафурыйский район. Заказник «Зилим».
4.	Государственный природный зоологический заказник республиканского значения «Наказбашевский». Куюргазинский район.
5.	Кугарчинский район. Заказник «Икский» д. Щербаки.
6.	Кугарчинский район. Заказник «Икский». Хутор Сюрень
7.	Хайбуллинский район. Заповедник «Шайтантау».
8.	Бурзянский район. Заказник «Алтын-Солок». д. Киленбай.
9.	Бурзянский район. д. Галиакберово.
10.	Бирский район. Заказник «Бирский».
11.	Аскинский район. д. Усть-Табаска.
12.	Белокатайский район. д. Карлыханово.
13.	Ишимбайский район. с. Макарово.
14.	Туймазинский район. п. Кандры.
15.	Буздякский район. с. Кузеево. Предуральская лесостепная зона.
16.	Мелеузовский район. Нац. парк Башкирия. Р-н Кашалы.
17.	Башкирский заповедник. Белорецкий район. с. Реветь
18.	Мишкинский район. д. Новоакбулатово. Заказник Алтын-Солок
19.	Бишбулякский район. д. Елбулактамак
20.	Аургазинский район. д. Куезбашево

21.	Мелеузовский район. п. Нугуш
22.	Белебеевский район. г. Белебей.
23.	Мелеузовский район. Национальный парк Башкирия. п. Нугуш
24.	Гафурийский район. с. Табынское.
25.	Бижбулякский район. д. Бижбуляк.
26.	Иглинский район. д. Иглино.

В результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенной по протоколу, в большинстве случаев наблюдалось достаточное количество продукта и хорошая воспроизводимость ISSR-маркеров, что свидетельствует об удалении ингибиторов ПЦР.

Результаты ISSR-анализа оценивали с использованием бинарной матрицы, в которой значения 1 и 0 указывают на наличие или отсутствие продукта, соответственно. Генетические отношения оценивались с использованием анализа кластеров UPGMA (невзвешенный парный метод с арифметическим средним), основанный на индексах генетического подобия.

На основании данных, полученных в ходе ISSR-анализа, с помощью программы TREECON, была построена дендрограмма по двум маркерам, отражающая генетическое сходство изученных образцов (рис.1).

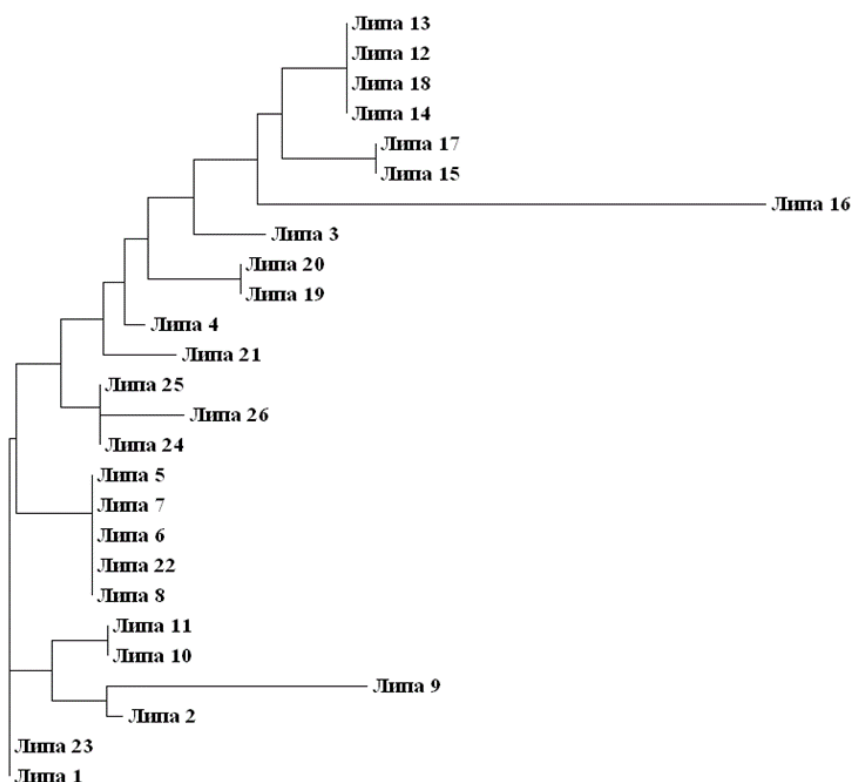


Рис. 1. Общая схема дендрограммы сходства образцов *T. cordata* на территории Республики Башкортостан с использованием генетического маркеров ISSR16 и ISSR17

Анализ филогенетического древа показал, что образцы под номерами 23 и 1 являются опорными объектами. Липовые образцы №16 и №9 филогенетически отдалены от других образцов. Проведение ISSR анализа образцов липы мелколистной из различ-

ных природных зон для выявления генетического полиморфизма с использованием маркеров ISSR16 и ISSR17 показало, что генетически близкими оказались образцы липы из Альшеевского района и Национального парка Башкирия. Наибольшее генетическое различие в исследуемой группе по выявлению генетического полиморфизма с использованием маркеров ISSR16 и ISSR17 установлено в липовых насаждениях из Давлекановского, Гафурийского, Кююргазинского и Бижбулякского районов, что может свидетельствовать о существовании в этих районах отдельных популяций липы мелколистной.

Необходимо отметить, что применение только двух маркеров не дало возможности выявить четких ареалов произрастания генетически различимых популяций лип. Следовательно, задачей для дальнейших исследований будет поиск, и расширение спектра индивидуальных маркеров для лип. Это в последующем поможет показать специфичность популяций липы и использовать их при оценке нектаропродуктивных популяций.

Литература

1. Doyle J. J. and Doyle J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue // Focus. - Vol. 12. - No. 1. - 1990. - P. 13-15.
2. Hossein Jafari S. Genetic differentiation between bitter and sweet asafetida plants using ISSR markers / Hossein Jafari, S., Sepehry, A., Soltanloo, H. et al. // Mol. Biol. Rep. – 2019. – V. 46. – 1069-1078.
3. Rafalski JA. Generating and using DNA markers in plants. / Rafalski JA, Vogel JM, Morgante M, Powell W, Andre C, Tingey SV. // Nonmammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. Academic Press. - 1996. – P. 75–134.
4. Singh Akanksha. Efficiency of SSR, ISSR and RAPD markers in molecular characterization of mungbean and other Vigna species / Singh Akanksha, Dikshit HK, Jain Neelu, Singh D, Yadav RN. // Indian journal of Biotechnology. – 2014. – V. 13. – P. 81-88.
5. Van de Peer Y. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Computer Application in the Biosciences. 1994. V.10. No. 5. P. 569–570.
6. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
7. Байрамгулова З.Х. Особенности генофонда солодки Коржинского на юго-востоке Башкортостана / З.Х. Байрамгулова, Н.Н. Редькина, Н.Р. Байрамгулов // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии. Материалы всероссийской молодежной конференции в рамках федеральной целевой программы «Научные и научнопедагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. ФГБОУ ВПО "Башкирский государственный аграрный университет». – 2010 – С. 32–37.
8. Водчиц Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц, И. О. Зайцева [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук : навучна-практычны журнал. – 2014. – №2. – С. 25-30.

9. Звягин А.С. Адаптация методики микросателлитного анализа для изучения генетического разнообразия сортов винограда пино белый, рислинг и их клонов / А.С. Звягин, Л.П. Трошин, Ж.М. Мухина [и др.] // «Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии». – Т.2 - Виноградарство. – Краснодар, 2005. – С.113-117.
10. Кулуев Б.Р. Молекулярно-генетическое исследование Одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum steven*) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров / Б.Р. Кулуев, А.В. Фатерыга, А.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. - 22 (1). – С. 102–107.
11. Тухватуллина Л.А. Редкие ресурсные дикорастущие луки флоры Башкортостана в условиях интродукции / Л.А. Тухватуллина, Л.М. Абрамова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2012. – №1. – С. 33–35.
12. Федоров Н.И. Сравнительный анализ изменчивости изоферментных локусов видов *Thalictrum L.* на Южном Урале / Н.И. Федоров, Н.Н. Редькина, Ю.А. Янбаев, О.И. Михайленко // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии. Материалы всероссийской молодежной конференции в рамках федеральной целевой программы «научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет». – 2012. – С. 90–92.

Application of ISSR markers to identify and assess genetic differentiation *Tilia cordata* Mill. of populations on the territory of the Republic of Bashkortostan

R. R. Khisamova¹, Kh. G. Musin², R. G. Farkhutdinov¹

¹*Bashkir State University
32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

Email: r.hisamova@mail.ru, frg2@mail.ru

To identify genetic polymorphism, markers ISSR16 and ISSR17 were used, which helped to a certain extent to establish the genetic relationship of linden plantations from different natural zones, as well as genetic differences.

Keywords: populations, linden, polymorphism, CTAB-method of DNA isolation, dendrogram.

Роль аутофагии в преждевременном старении клеток НМРЛ, индуцированном окислительным стрессом

© С.Е. Храпов, З.И. Абрамова *

*Казанский (Приволжский) федеральный университет
Россия, Республика Татарстан, 420008 г. Казань, улица Кремлевская, 18*

**Email: ziabramova@mail.ru*

Установлено, что изменение уровня аутофагии в клетках НМРЛ, связано с окислительным стрессом.

Ключевые слова: аутофагия, окислительный стресс, старение, немелкоклеточный рак легкого.

Увеличение продолжительности жизни человека предполагает активное долголетие. Прогресс геронтологии привел к тому, что ожидаемая продолжительность жизни увеличилась за последние пятьдесят лет с 57,4 лет (1968г.) до 72,6 (2018г.) лет [1], но проблема долголетия все еще актуальна, т.к. связана с развитием патологических процессов. Одна из популярнейших теорий старения - теория свободных радикалов. Согласно этой теории, под действием внешних факторов происходит утечка активных форм кислорода (АФК), и вместо выполнения обычных функций, они реагируют с макромолекулами, повреждая их. Так могут возникать мутации в ДНК и РНК, повреждаться мембрана, за счет реакций с липидами, нарушаться конформация белков. В клетках существуют молекулы-антиоксиданты, предотвращающие такие повреждения, путем устранения АФК, например супероксиддисмутазы, каталазы и т.д., но при избытке АФК или недостатке антиоксидантов возникает окислительный стресс - превышение продукции активных форм кислорода и азота над их инактивацией антиоксидантами. Эта теория объясняет не только старение, но и множество патологических процессов связанных со старением, например опухолевая трансформация [2]. Окислительный стресс – серьезное испытание для клетки: молекулы антиоксиданты уже не справляются с АФК, а последние наносят все больший урон не только макромолекулам в цитоплазме, но и органеллам, повреждая их. Для того, чтобы не допустить непоправимого, в клетке существуют механизмы программируемой клеточной гибели: апоптоза (ПКГ I типа) и аутофагии ПКГ II типа). Согласно исследованиям [3,4,5], аутофагия и АФК принимают участие в одних и тех же процессах, например при гипоксии, реоксидации, голодании, это в свою очередь позволяет предположить, что АФК являются молекулами-индукторами аутофагии.

Целью работы является оценка роли аутофагии в преждевременном старении в опухолевых клетках немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ). Для достижения цели поставлены следующие задачи: (1) Установить уровень АФК в клетках НМРЛ в динамике после добавления H_2O_2 методом окрашивания дигидрородамином 123; (2) Установить уровень апоптоза и некроза в культуре клеток НМРЛ в динамике; (3) Установить изменение уровня аутофагии в клетках НМРЛ, вызванного окислительным стрессом.

В качестве модели НМРЛ использовали культуру клеток А549. Клетки делили на три группы, состояние которых определяли через 0, 24, 48 часов после добавления H_2O_2 . По истечении времени, в две лунки добавляли дигидрородамин 123 (Thermo Fisher

Scientific (USA)), лунки инкубировали в темноте 60 мин при 37°C в присутствии 5% CO₂, затем обрабатывали трипсином и промывали. Для анализа уровня аутофагии и апоптоза использовали Autophagy Assay Kit – ab139484 Annexin V-FITC Apoptosis Staining / Detection Kit – ab14085 (Abcam plc, UK). Образцы анализировали на приборе FACSCalibur. Полученные результаты обрабатывали в программе FlowJo X.

В результате при анализе уровня АФК в клетках A549 установили, что через 24 часа после добавления в питательную среду H₂O₂ уровень АФК в клетках снижается, о чем свидетельствует изменение уровня флуоресценции (с 147 у.е. до 54 у.е.) на фоне снижения количества клеток, примерно, на 25% (рис.1, зеленый пик). Через 48 часов количество клеток с таким же уровнем АФК увеличивается на 10% (рис.1, оранжевый пик).

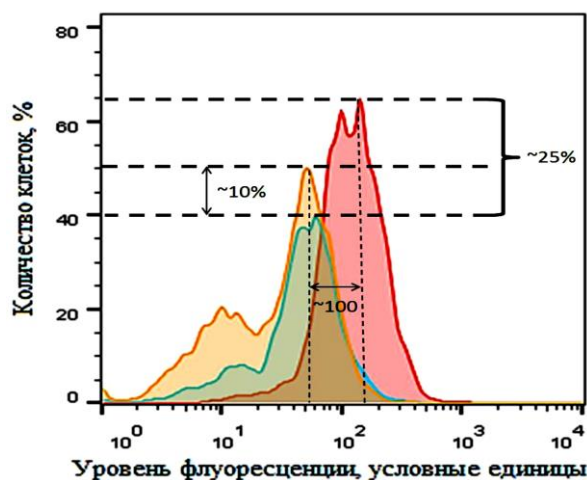


Рис.1. Анализ уровня АФК в свежевыделенных клетках (красный пик), через 24ч (зеленый пик) и 48 ч (оранжевый пик) культивирования.

Для того чтобы определить с чем связаны изменения количества клеток в процессе культивирования, мы определяли форму клеточной гибели.

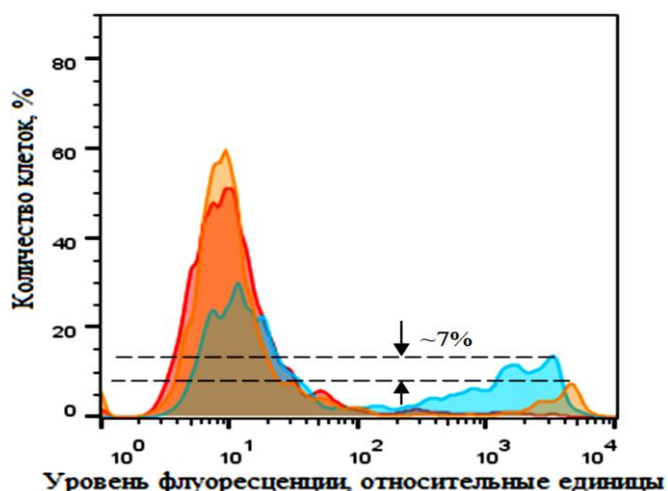


Рис.2. Анализ изменения уровня некротических клеток в процессе культивирования через 24 ч (синий пик) и 48 ч (оранжевый пик) культивирования. Уровень интенсивности некроза в клетках оценивали по уровню интенсивности флуоресценции.

Клетки на стадии апоптоза практически отсутствовали. Оценка уровня клеток на стадии некроза (рис. 2) показала, что через 24 часа уровень некротических клеток составлял 14% (рис.2, синий пик) и снизился до 7% через 48 час культивирования (рис.2 оранжевый пик). Эти результаты позволяют предположить, что мы получили составшуюся культуру клеток.

При оценке клеток на стадии аутофагии мы показали, что активность аутофагии повышается. Как следует из рис. 3 в образце клеток до культивирования после добавления H_2O_2 можно выделить две популяции клеток: большинство клеток с достаточно низкой интенсивностью аутофагии (около 50%) и с высоким уровнем активности аутофагии (около 17%). Через 24 часа культивирования количество клеток с повышенной интенсивностью аутофагии превысило 65% и снизилось до 40% через 48 часов культивирования.

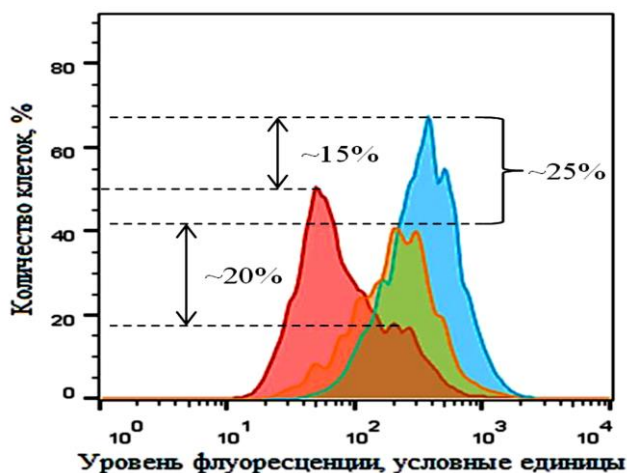


Рис. 3. Оценка уровня количества клеток и уровня экспрессии аутофагии в культуре до культивирования (красный пик). через 24 ч (синий пик) и 48 ч (оранжевый пик) культивирования.

Уровень АФК снижался на фоне увеличения интенсивности аутофагии, т.е. можно предположить, что АФК участвуют в индукции аутофагии в клетках. В своей работе авторы [5] также пишут, что АФК являются эффективными индукторами аутофагии. Кроме того с учетом данных литературы и наших данных, можно предположить, что старение опухолевых клеток приводит к нарушениям самого процесса аутофагии (ПКГ II типа), и как следствие нарушению клиренса опухолевых клеток, что возможно, приводит к развитию патологического процесса за счет увеличения аутоантигенов при гибели опухолевых клеток путем некроза.

Литература

1. Life expectancy at birth, total (years). The World Bank Group // World Bank Group [Electronic resource]. – 2018. – URL: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.LE00.IN?end=2018&start=1960> – Accessed: 20.03.2021.
2. Мелихова Л.В., Чентиева Л.А., Лущик М.В. Основные теории старения //Международный студенческий научный вестник. 2016. Т. 4. С. 156-157.
3. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs //Cell Death and Differentiation . 2015. V. 22. P. 377–388.
4. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014. Т. 12. С. 13-21.
5. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе //Бюллетень сибирской мдицины. 2019.Т. 18. С. 195–214.

The role of autophagy in premature aging of NSCLC cells induced by oxidative stress

S. E. Khrapov, Z. I. Abramova *

*Kazan (Volga Region) Federal University
Russia, Republic of Tatarstan, 420008 Kazan, Kremlevskaya street, 18*

* Email: ziabramova@mail.ru

It was found that changes in the level of autophagy in NSCLC cells are associated with oxidative stress.

Key words: autophagy, oxidative stress, aging, non-small cell lung cancer.

Проблемы и перспективы оценки генетического разнообразия лиственниц

© Шарифьянова Ю.В.¹, Михайлова Е.В.^{2*}.

¹Башкирский Государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, улица Проспект Октября, 71.

*E-mail mikhele@list.ru

Среди растений рода *Larix* (Лиственницы) встречаются редкие образцы с декоративной формой кроны. Особенный интерес представляют генетические исследования таких образцов с целью развития методов их селекции и усиления мер охраны. На данный момент накоплен обширный материал по исследованию генетических ресурсов различных видов лиственниц. Разработаны группы молекулярно-генетических маркеров, позволяющих провести популяционно-генетический анализ, изучить структуру генома и генетическое разнообразие лиственниц. В связи с этим, перспективно применение полученных ранее знаний, для исследования генетического материала Кужановских лиственниц, являющихся достоянием Республики Башкортостан.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, Кужановские лиственницы, генетическое разнообразие, ДНК-маркеры

Кужановские лиственницы, предположительно являющиеся формой лиственницы Сукачева (*L. sukaczewii* Dyl.) [1] – уникальный памятник природы Башкортостана. Их особенность заключается в раскидистой, шаровидной форме кроны, когда как обычно лиственницы имеют выраженный прямой ствол. Произошедший в 2020 году акт вандализма показал, как пагубное воздействие человека может в дальнейшем привести к сокращению и даже полному исчезновению столь редких и необыкновенных деревьев, 11 из которых уже находятся под угрозой гибели в Башкирии. Ввиду их малочисленности и уникальности нельзя недооценивать всю важность и необходимость принятия более строгих охранных мер.

Одним из решающих аргументов в пользу усиления защитных мероприятий может стать установление причины особенности формы кроны лиственниц. Однако, на данный момент существует несколько версий, объясняющих механизм возникновения необычного внешнего вида деревьев, среди которых однозначно достоверной нет. Основная гипотеза – инактивация апикального доминирования, приводящая к преимущественному росту боковых побегов, а не центрального. Причиной изменений, по мнению ученых, может быть мутация, приводящая к нарушению гормональной регуляции морфогенеза, или инфекция. Что бы установить какая из гипотез верна, стоит использовать генетические методы исследования.

Сложность исследования генетического материала семейства хвойных связана, во-первых, с большим содержанием фенольных соединений, что в значительной степени затрудняет выделение чистой ДНК. Во-вторых, с большим объемом ядерного генома,

в 4–9 раз превышающий геном человека и состоящий на 70–80 % из высокоповторяющихся элементов [2].

В последние годы появились новые возможности исследования генетической информации с использованием молекулярных методов анализа. Одними из инструментов изучения генетических процессов являются молекулярно-генетические маркеры. Большой вклад в исследование лиственниц сделан с помощью анализа маркеров ДНК митохондриальных и хлоропластных генов. Известна работа, в которой с использованием метода RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) выявлена связь японской лиственницы к лиственницам с Корейского полуострова [3].

Для исследования генетического полиморфизма популярно применение микросателлитных ДНК-маркеров (SSR-маркеры). Ранее для микросателлитных фрагментов были разработаны маркеры для лиственницы японской (*L. kaempferi* Sarg.) – группа bcLK [4], лиственниц альпийской (*L. lyallii* Parl.) и западной (*L. occidentalis* Nutt.) группы – UAKLY [5, 6] и UBCLX [7]. Полиморфизм лиственницы сибирской (*L. sibirica* Ledeb.) был выявлен группой маркеров bcLK: bcLK056, bcLK224, bcLK232, bcLK235 и bcLK260 [8]. Из ISSR-праймеров (межмикросателлитные маркеры) для популяционно-генетического анализа ДНК лиственницы эффективны следующие пять: (AC)8CT, (ACC)6G, (AGC)6C, (GAC)6C, (CA)6GT [9].

На данный момент секвенирован полный геном лиственницы Сибирской (8463518 GenBank ID) и Тонкочешуйчатой (*L. kaempferi*, 23484598 GenBank ID). Это позволяет проводить биоинформатический поиск и подбор не только универсальных генетических маркеров, но и конкретных генов, которые могут быть задействованы в формировании особой формы кроны.

Таким образом, в настоящее время накоплен обширный материал о структуре, генетическом разнообразии, внутри- и межвидовой дифференциации популяций большого числа различных видов лиственниц. Использование мирового опыта позволит изучить генотип Кужановских лиственниц.

Литература

1. Суюндуков, И. В. О сохранении уникальных Кужановских лиственниц на территории памятника природы «Урочище Ултык-Карагас хр. Крыктытау» // Материалы Всероссийской научно-практической конференции смеждународным участием «Актуальные вопросы охраны биоразнообразия на заповедных территориях». 24 – 26 ноября 2020 г., Уфа, С. 398
2. Kuzmin D. A., Feranchuk S. I., Sharov V. V., Cybin A. N., Makolov S. V., Putintseva Y. A., Oreshkova N. V., and Krutovsky K. V. Stepwise large genome assembly approach: A case of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb) // BMC Bioinformatics. 2019. №20. P. 36 – 46
3. Kisanuki H., Ide Y., Isoda K., Shiraishi S. Molecular analysis of taxa in the genus *Larix* using randomly amplified polymorphic DNA. Improvement of larch (*Larix* sp.) for better growth, stem form and wood quality // Proc. of an Intern. Symp. Gap, 2002. P. 475 – 484
4. Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Molecular Ecology. 2006. V.6, I.3. P. 664 – 666.

5. Khasa D.P., Newton C.H., Rahman M.H., Jaquish B., Dancik B.P. Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch // *Genome*. 2000. №43 (3) P. 439 – 448.
6. Khasa D.P., Jaramillo-Correa J.P., Jaquish B., Bousquet J. Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns // *Molecular Ecology*. 2006. V.15, I.13. P. 3907 – 3918
7. Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T., Kenawy A., Newton C.H., El-Kassaby Y.A. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) // *Molecular Ecology Resources*. 2009. V.9, I.3. P. 843 – 845
8. Кулаков Е.Е., Сиволапов В. А., Воробьева Е. А., Сиволапов А. И. Генетическая изменчивость лиственницы Сукачева (*Larix Sukaczewii* Djil.) в географических культурах под Воронежем // *Лесотехнический журнал*. 2018. №1. С. 35 – 40
9. Нечаева Ю.С., Боронникова С.В., Юсупов Р.Р., Хайнце Б. Изучение полиморфизма ISSR-маркеров в природных и искусственных популяциях лиственницы // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 6-6. С. 1426 – 1431.

Методы количественного анализа гидролитической активности с использованием гелей с иммобилизованным субстратом

© И.А. Шпирная¹, В.О. Цветков¹, Н.Д. Рябцева²

¹ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32

²ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет
Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, улица Ленина, 3

E-mail: i-shia@yandex.ru

Сотрудниками кафедры биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета разработаны ряд относительно простых и удобных в применении методов количественного определения активности гидролитических ферментов и их ингибиторов. Принцип методов заключается в иммобилизации субстрата фермента в гель агарозы или полиакриламидный гель (ПААГ) и последующем определении энзиматической активности: либо по размеру площади гидролиза субстрата вокруг лунок с ферментным раствором, либо по величине светопропускания через участки геля с субстратом. Показана применимость методов для определения активности протеиназ, карбогидраз, эстераз, а также ингибиторов этих ферментов в различных биологических объектах.

Ключевые слова: ферменты, количественное определение, гель, цифровая обработка, модификация

Известно, что лабораторные исследования требуют использования разнообразных методик, которые не всегда могут быть реализованы, в первую очередь из-за недостаточности материально-технической базы.

В рамках своих исследований Ибрагимов Р.И. – заведующий (2000-2017 гг.) кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета (г. Уфа) разрабатывал оригинальные и доступные методы для решения поставленных задач [1].

И в настоящее время одним из направлений, которое активно развивается на кафедре биохимии и биотехнологии, является разработка и модификация методов детекции ферментативной активности, начало которым положили работы Рината Исмагиловича.

Ибрагимовым Р.И. были разработаны методы определения активности свободных и «связанных» ингибиторов протеаз, находящихся в составе комплекса с ферментом [2], был предложен метод количественного определения протеолитических ферментов и их ингибиторов с использованием фотопластин [3].

Суть предложенного им метода состояла в использовании специальных фотопластинок для ядерных исследований. Поверхность пластины со стороны желатинового слоя покрывалась агарозным гелем. В геле вырезали лунки, которые заполняли раствором фермента. Пластины выдерживали заданное время во влажной камере. Молекулы фермента из раствора диффундируют в гель и гидролизуют желатину (субстрат) вокруг лунки (рис.1). Скорость диффузии молекул в геле пропорциональна исходной кон-

центрации фермента в растворе. После окончания инкубации агарозный гель снимают, пластину промывают водой. Гидролизованные участки желатинового покрытия хорошо смываются и проявляются на темном фоне в виде светлых участков округлой формы. Определение ферментативной активности проводится путем измерения интенсивности светового потока, проходящего через гидролизованный участок желатина. Для этой цели был разработан и сконструирован прибор, позволяющий измерять интенсивность света, проходящего через пластину. Это устройство состоит из источника света, фотоприемника и измерительного прибора. Для проведения замеров фотопластинка помещается между источником света и фотоприемником устройства. Активность фермента определяется по интенсивности светового потока, проходящего через гидролизованные участки желатинового слоя фотопластинки [3].

Метод позволяет обнаружить и измерить активность желатингидролизующих протеиназ и их ингибиторов из различных источников, характеризуется высокой чувствительностью. По сравнению со спектрофотометрическими методами, в описанной процедуре используются микрообъемы ферментных растворов (5-10 мкл), что снижает расход препаратов в несколько десятков раз.



Рис.1. Фотопластинка после инкубации с растворами ферментов (видны округлые зоны гидролиза желатинового слоя).

Дальнейшие работы в этом направлении привели к существенному расширению спектра анализируемых ферментов за счет включения различных субстратов в 1% гель агарозы. Благодаря этому студенты и аспиранты кафедры биохимии и биотехнологии стали активно проводить эксперименты по определению активности различных протеиназ (рис.2), карбогидраз, эстераз. Данные методики подробно описаны в работах [4-8]. Все преимущества метода-прототипа при этом сохранялись, однако широкое использование методов ограничивалось дороговизной высокоочищенной агарозы, поскольку только такая форма образовывала стабильные гели без деформации лунок и позволяла получать валидные результаты анализа.

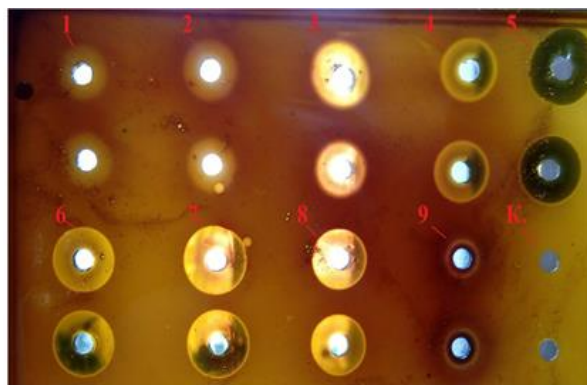


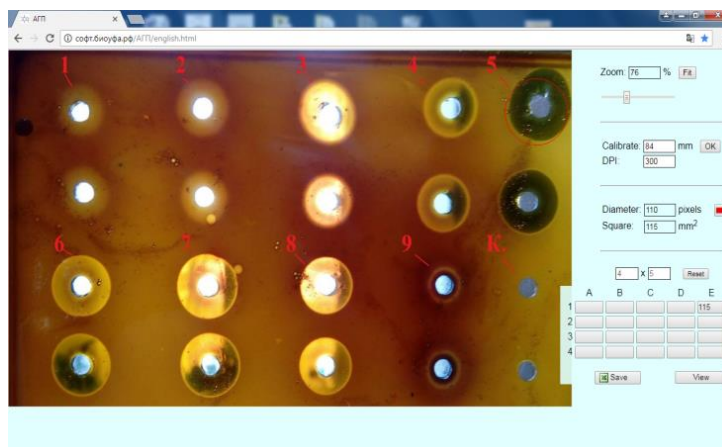
Рис.2. Агарозная пластина с иммобилизованным казеином после инкубации с экстрактами плодовых тел трутовиков (источник ферментов) и окраски бромфеноловым синим.

Попытки заменить агарозу на более дешевые субстраты привели к существенной модификации метода. Метод с применением полиакриламидного геля позволил значительно сократить время и снизить расход реактивов для определения ферментативной активности, однако использование ПААГ было возможным только при отсутствии в нем лунок для заливки раствора (Рис.3). Изыскания в этом направлении привели к разработке принципиально иного технического исполнения, подробно описанного в работах [9-11].

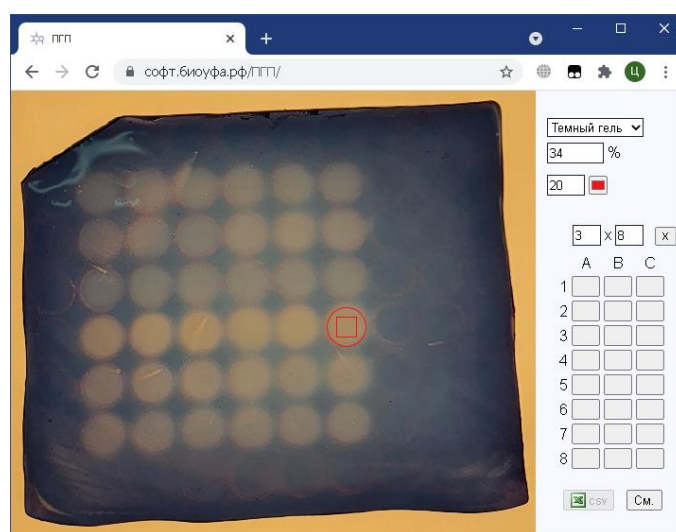


Рис. 3. ПААГ с иммобилизованным крахмалом после инкубации с растворами-источниками амилолитической активности

Доступность цифровой техники позволила обрабатывать изображения гелей для количественного определения ферментативной активности (Рис. 4 а,б). Были разработаны программные инструменты для количественного определения уровня активности ферментов и их ингибиторов на основе анализа оцифрованных гелей [12-16].



(А)



(Б)

Рис.4. (А) Компьютерная программа для расчета площади гидролизованного участка агарозной пластины <https://софт.биоуфа.рф/АГП/> (Б) Компьютерная программа для расчета площади гидролизованного участка ПААГ <https://софт.биоуфа.рф/ПГП/>

Использование данных методов лежит в основе многочисленных дипломных проектов студентов кафедры биохимии и биотехнологии, используется при выполнении кандидатских диссертаций.

Литература

1. Шпирная И.А., Фархутдинов Р.Г. , Яруллина Л.Г. , Марданшин И.С. , Цветков В.О. Памяти профессора Ибраимова Рината Исмагиловича – к 65-летию со дня рождения // Биомика. 2021. №2. С. 227-243.
2. Ибрагимов Р.И., Яковлев В.Г., Ахметов Р.Р. Определение активности ингибиторов в составе комплекса с протеиназой // Физиология и биохимия культурных растений. 1987. № 1. С. 51-54.

3. Ибрагимов Р.И., Ахметов Р.Р., Хабибуллин С.И. Способ определения активности протеолитических ферментов. Патент на изобретение RU 2175134 С1. 20.10.2001.
4. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов по гидролизу субстрата в геле агарозы // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т.45(4). С.497–501.
5. Шевченко Н.Д., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. Метод измерения активности пектиназ по гидролизу иммобилизованного субстрата // Аграрная Россия. 2009. № S1. С. 133-134.
6. Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И., Шпирная И.А., Умаров И.А., Хамадалиев Р.Ф. Активность компонентов системы "эстеразы - ингибиторы эстераз колорадского жука" в тканях картофеля // Вестник Башкирского университета. 2008. Т. 13. № 4. С. 922-925.
7. Шевченко Н.Д., Шпирная И.А., Салыхова А.Ф., Цветков В.О., Марданшин И.С., Ибрагимов Р.И. Активность ингибиторов целлюлаз, пектиназ в клубнях и листьях картофеля // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 6 (100). С. 431-433.
8. Шляпникова С.В., Батырова Э.Р., Цветков В.О., Шпирная И.А. Изучение молоко-свертывающей активности ферментов трутовых грибов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 3-1. С. 228-232.
9. Цветков В.О., Шпирная И.А., МаксUTOва В.О. Способ количественного определения протеолитической активности ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле. Патент на изобретение RU 2701734 С1. 01.10.2019.
10. Цветков В.О., Шпирная И.А., МаксUTOва В.О. Способ количественного определения амилолитической активности ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле. Патент на изобретение RU 2708087 С2. 04.12.2019.
11. Цветков В.О., Шпирная И.А., МаксUTOва В.О., Ибрагимов Р.И. Определение активности амилаз и протеаз с использованием субстратов, иммобилизованных в поликриламидном геле // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. 2018. № 3-5. С. 81–85.
12. Ибрагимов Р.И., Фазлытдинов М.Ф., Цветков В.О., Шпирная И.А. Инструмент количественной оценки активности амилолитических ферментов и ингибиторов амилаз по площади зоны гидролизованного крахмала, иммобилизованного в гель агарозы. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2015612790. 26.02.2015.
13. Ибрагимов Р.И., Цветков В.О., Шпирная И.А. Инструмент определения ферментативной активности по интенсивности пятен на зимограммах. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2015661375. 26.10.2015.
14. Фазлытдинов М.Ф., Шпирная И.А., Цветков В.О., Ибрагимов Р.И., Умаров И.А. Программа для измерения активности пектиназ и их ингибиторов на пластинах агарозного геля. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 20120610010 1. 10.01.2012
15. Цветков В.О., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. Сервис просмотра и анализа структуры биомолекул. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2016615885, 01.06.2016. Заявка № 2016612978 от 04.04.2016.

16. Цветков В.О., Шпирная И.А., Максимова В.О. Инструмент определения гидролитической активности по гидролизу субстрата в полиакриламидном геле. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2018611900. 08.02.2018.

Methods of quantitative analysis of hydrolytic activity using gels with an immobilized substrate

Employees of the Department of Biochemistry and Biotechnology of Bashkir State University have developed a number of relatively simple and easy-to-use methods for quantifying the activity of hydrolytic enzymes and their inhibitors. The principle of the methods is to immobilize the enzyme substrate in agarose gel or polyacrylamide gel (PAAG) and then determine the enzymatic activity: either by the size of the substrate hydrolysis area around the wells with the enzyme solution, or by the amount of light transmission through the gel sections with the substrate. The applicability of methods for determining the activity of proteinases, carbohydraz, esterases, as well as inhibitors of these enzymes in various biological objects is shown.

Keywords: enzymes, quantitative determination, gel, digital processing, modification

Биологическая активность β -глюканов базидиальных грибов

© А.В. Шуганова, И.А. Шпирная

ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет
Россия, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32

E-mail: i-shia@yandex.ru

Базидиомицеты являются доступным источником ценных биологически активных соединений. Вызывает интерес механизм иммуномодулирующего действия препаратов производимых из высших грибов. По данным литературы, иммуностимулирующий эффект грибных БАД может быть связан с содержанием в них значительного количества β -глюканов, действующих на специфические клеточные рецепторы. Химическая модификация данных полисахаридов способствует расширению спектра их биологической активности.

Ключевые слова: базидиомицеты, β -глюканы, клеточные рецепторы, иммуномодуляция, химическая модификация.

Базидиальные грибы широко употребляются в пищу и служат источником ценных биологически активных веществ: растворимого белка, ферментов [1], липофильных компонентов [2-4], а также биологически активных полисахаридов.

β -глюканы представляют собой семейство полисахаридов, структурные звенья которых состоят исключительно из D-глюкозы, соединенных посредством бета-гликозидных связей. Полисахариды из разных источников могут отличаться молекулярной массой и трехмерной структурой [5,6], они широко распространены в природе, их синтезируют бактерии, растения, грибы и лишайники [7].

β -глюканы являются одними из основных компонентов клеточной стенки базидиальных грибов. На рис.1 схематично представлены компоненты клеточной стенки, организованные в слоистую структуру, в которой (1-3)- β -глюкан образует плотно переплетенные микрофибриллы, занимающие самый внутренний слой, за которыми следуют (1-6)- β -глюкан и маннопротеины) [8].

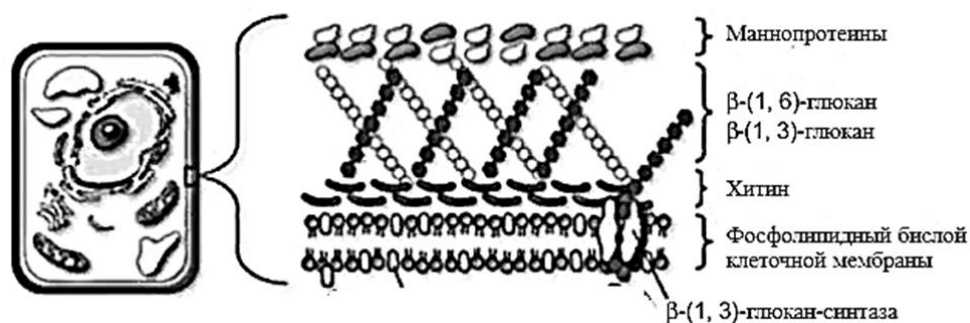


Рис.1. Состав базидиальной клеточной стенки (по Mohammad-Fata Moradali et al. 2007 г.) [9].

Клеточная стенка защищает клетку от действия осмотического давления и стрессовых факторов окружающей среды, определяет ее форму. Как видно на рисунке (рис.1) в составе клеточной стенки обнаружена β – глюкансинтаза - локализованный на плазматической мембране фермент, который катализирует внутриклеточный синтез (1-3)- β -глюкана. Ингибирование этого фермента способствует истощению глюканполимеров в грибковой клетке, что приводит к аномально слабой клеточной стенке, неспособной противостоять осмотическому стрессу [10].

Препараты β -глюканов, полученные из мицелия и плодовых тел базидиомицетов имеют важное практическое значение, в частности они являются иммуномодуляторами, влияющими на регуляцию иммунных реакций при инфекционных и опухолевых заболеваниях [11]. На отечественном рынке распространены такие препараты как: *Lentinus edodes* (Эвалар, Россия), *Lentinex GlycaNova* (Испания), Чага (Вистерра, Россия), *Imunix 100* «IXX pharma», (Бельгия), Ревифорт НПЦРИЗ (Россия) и др., которые используются как лекарственные средства, в качестве биологически активных добавок, в косметологии.

β -глюканы являются мощными иммуномодуляторами, оказывающими влияние как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет. Механизм действия их реализуется за счет воздействия на различные иммунные рецепторы, которые могут вызывать широкий спектр иммунных реакций [12, 13]. Эти рецепторы действуют как PRR (паттерны рецептора распознавания), и включают в себя: дектин-1, рецептор комплемента 3 (CR3; CD11b / CD18), рецепторы скавенджеров (SR), лактозилцерамид (LacCer) и toll-подобные рецепторы (TLR) [14]. Благодаря их активации, высвобождаются цитокины, включая интерлейкин (ИЛ)-12, ИЛ-6, фактор некроза опухоли (ФНО)- α и ИЛ-10 [15].

Часть бета-глюканов с током крови через воротную вену попадают в печень, где захватываются купферовскими клетками, которые в ответ на взаимодействие с полисахаридами выделяют цитокины, активирующие системный иммунитет. В частности бета-1,3/1,6-D-глюкан стимулирует продукцию фактора некроза опухоли, который, в свою очередь, активирует моноцитарную систему иммунитета [16].

На сегодняшний день известны и хорошо изучены следующие представители базидиальных бета-D-глюканов: лентинан (из шиитаке *Lentinula edodes*) [4], шизофиллан (Сонифилан, SPG) (из щелелистника обыкновенного *Schizophillum commune*) [17], плевран (из вешенки устричной (обыкновенной) *Pleurotus ostreatus*) [18], грифолан (из мэйтаке *Grifola frondosa*) [19], полисахарид пептид (PSP) и полисахарид крестин (PSK) (из траметеса разноцветного – *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor*)) [20], а так же ганодеран (из трутовика лакированного (рейши) *Ganoderma lucidum*) [21].

Анализируя данные литературы можно выделить следующие структурные особенности бета-глюканов базидиомицетов:

- являются гомополисахаридами с разветвлённой структурой, что способствует формированию спирали с третичной структурой [22];
- ветвления образуются за счет образования (β -(1,3)-, и (или) β -(1,6)-связей) [6];
- для природных бета-глюканов не выявлено дополнительных функциональных групп [23];

Отличия в их биологическом эффекте могут зависеть от степени ветвления и полимеризации [24].

Для природных бета-глюканов не выявлено дополнительных функциональных групп, однако при обработке они могут легко подвергаться химическим модификациям. В литературных источниках присутствуют многочисленные данные, подтверждающие факты расширения спектра биологической активности модифицированных природных бета-глюканов. Так, например, при сульфатировании бета-глюкан (S-TM8s), полученный из *Pleurotus regium* обладал мощной противовирусной активностью [25]. Карбоксилированный (1,3;1,6)-бета-D-глюкан, выделенный из склероций *Pleurotus tuber-regium*, является мощным стимулятором макрофагов и активаторами высвобождения ФНО- α , что предполагает их потенциальное применение в противоопухолевой терапии [26]. Ацетилирование глюкана, выделенного из съедобного гриба *Pleurotus albidus*, дифференцированно регулируют липид-индуцированное воспаление и образование пенных клеток в макрофагоподобных клетках [27]. Способность аминированного бета-глюкана связывать желчные кислоты была исследована *in vitro*, что показало значительно более высокую активность связывания желчных кислот, чем нативный β -глюкан. Более того, производное β -глюкана показало выраженные антимикробные эффекты против *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* [28].

Литература

1. Шляпникова С.В., Батырова Э.Р., Цветков В.О., Шпирная И.А. Изучение молоко-свертывающей активности ферментов трутовых грибов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 3-1. С. 228-232.
2. Шпирная И.А., Лебедев Я.П., Шаймухаметова М.О., Баширова Р.М., Цветков В.О. Биологически активные соединения из экстракта чаги *Inonotus obliquus* (pers.) pill// В сборнике: Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием. 2017. С. 180-182.
3. Галимова Г.Ф., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. Липофильные соединения шиитаке, при культивировании на березовом субстрате // В книге: Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании. Тезисы докладов IX Международной школы-конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых. 2016. С. 373.
4. Шпирная И.А., Баширова Р.М., Цветков В.О. Компоненты гексанового экстракта плодовых тел трутовика чешуйчатого // В сборнике: Фундаментальные основы современных аграрных технологий и техники. Сборник трудов Всероссийской молодежной научно-практической конференции. Национальный исследовательский Томский политехнический университет. 2015. С. 170-172.
5. Kim MS, Lee KA: Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *J Ethnopharmacol* 105. 2006. P. 342- 345.
6. Беседнова Н.Н., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н. и др. Иммуностропные свойства 1,3;1,6- β -D-глюканов. Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 2. P. 37–44.
7. Oh JK, Lee DI, Park JM. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery // *Progress in Polymer Science*. 2009. V. 34 (12). P.1261-1282.
8. Nakano H, Namatame K, Nemoto H, Motohashi H, Nishiyama K, Kumada K: A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of

life. Kanagawa Lentinan Research Group // Hepatogastroenterology. 1999. V.46. P. 2662-2668.

9. Mohammad-Fata Moradali, Mostafavi H., Ghods S. and Hedjaroude G-A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) // International Immunopharmacology. 2007. № 7. P. 701-724.

10. Seetharaman R., Palaniyappan S., Karupannan P. and Nanjian R. Polysaccharides from Basidiomycetes: A Promising Source for Immunostimulating and Anticancerous activity // Biotechnology: Concepts and Applications. Edition: First edition Chapter: XII Publisher: Narosa publishing house. 2008. P. 232-269.

11. Kodama N., Komuta K., Nanba H.. Can maitake MD-fraction aid cancer patients? // Alternative Medicine Review. 2002. № 7. P. 236-239.

12. Stier H., Ebbeskotte V., Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan // Nutrition Journal. 2014. 13(1):38.

13. Jamas S., Eason D., Ostroff Gr., Onderdonk Ab. Pgg-Glucans - A Novel Class Of Macrophage-Activating Immunomodulators// Polymeric drugs and drug conjugates.1991. Chapter 5. P. 44-51.

14. Fang J., Wang Y., Lv X., Shen X., Ni X., Ding K. Structure of a beta-glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- κ B signaling. Glycoconj. J. 2012. V. 29.P. 365–377.

15. Heufler C., Koch F., Stanzl U. "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells"// European Journal of Immunology. 1996. V. 26, №. 3. P. 659–668.

16. Okamura K., Suzuki M., Chihara T., Fujiwara A., Fukuda T., Goto S., Ichinohe K., Jimi S., Kasamatsu T., Kawai N. Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study // Cancer 1986. 58:865-872.

17. Beltran-Garcia M. J., Estearron-Espinosa, and O. Tetsuya. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities // Journal Agricultural and Food Chemistry. 1997. 45:4049-4052.

18. Adachi Y., Ohno N., Ohsawa M., Sato K., Oikawa S., Yadomae T. Physicochemical properties and antitumor activities of chemically modified derivatives of antitumor glucan "grifolan LE" from *Grifola frondosa* Chem Pharm Bull (Tokyo). 1989. V. 37 (7). P. 1838-1843.

19. Chang Jing; Zhang Meng; Jiang Wei; Liu Yun; Liu Heng. Preclinical and Clinical Studies of *Coriolus versicolor* Polysaccharopeptide as an Immunotherapeutic in China // Discovery. 2017. P. 207-219.

20. Wasser S., Weis A. Medicinal Mushrooms. Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst). // Haifa. 1997. P.39.

21. Roman R., Sasisekharan B., Sasisekharan R. Structural representations of the biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions // Cell Chemical Biology. 2005. – V.12.P. 267-77.

22. Syed, H. A. The world of β -glucans – a review of biological roles, applications and potential areas of research // Thesis for the requirement of master of Science – Medical Biology. 2009. P. 13-18.

23. Wasser S.P. Medicinal mushrooms As a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides //Applied Microbiology and Biotechnology. 2002. V. 60. P. 258 – 274.
24. Liu W., Wang H., Yao W. Effects of Sulfation on the Physicochemical and Functional Properties of a Water-Insoluble Polysaccharide Preparation from *Ganoderma lucidum*// Journal of Agricultural and Food Chemistry.2010.p.3336-3341.
25. Majtan J., Kogan G., Kovacova E., Bilikova K. Stimulation of TNF-alpha release by fungal cell wall polysaccharides// Zeitschrift fur Naturforschung. 2005. P. 921- 926.
26. Castro-Alves V., Oliveira do Nascimento J., Alpha- and beta-D-Glucans from the edible mushroom *Pleurotus albidus* differentially regulate lipid-induced inflammation and foam cell formation in human macrophage-like THP-1 cells // International Journal of Biological Macromolecules . 2018. P. 1222-1228.
27. Shin M.S., Lee S., Lee K., Lee H. Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat beta-glucan // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. 53(14):5554-8
28. Okazaki M., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T. Structure-activity relationship of (1—>3)-betaD-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro // Biological & Pharmaceutical Bulletin.1995.18:1320-1327.

Biological activity of β -glucans of basidiomycetes

Basidiomycetes are an affordable source of valuable biologically active compounds. The mechanism of the immunomodulatory effect of drugs produced from higher fungi is of interest. According to the literature, the immunostimulating effect of mushroom dietary supplements may be associated with the content of a significant amount of β - glucans acting on specific cellular receptors in them. Chemical modification of these polysaccharides contributes to the expansion of the spectrum of their biological activity.

Key words: basidiomycetes, β -glucans, cellular receptors, immunomodulation, chemical modification.

Полигенный анализ генетических маркеров долголетия с использованием программы APSampler

© В.В. Эрдман^{1*}, И.А. Туктарова¹, К.В. Данилко², Я.Р. Тимашева^{1,2}, Т.В. Викторова², Т.Р. Насибуллин¹

¹*Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН*

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

²*Башкирский государственный медицинский университет*

Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, ул. Ленина 3.

*Email: danivera@mail.ru

Установлены мультилокусные маркеры долголетия в этнической группе русских, жителей Республики Башкортостан, по ряду генов, участвующих в адаптации. Ключевые гены выявленных полигенных кластеров кодируют ферменты, участвующие в метаболизме активных форм кислорода первого и второго этапов, а также токсичных соединений эндогенной и экзогенной природы.

Ключевые слова: долголетие, генетический полиморфизм, мультилокусный анализ, APSampler, адаптация, гены ферментов метаболизма свободных радикалов и токсичных соединений

Долголетие – сложный феномен человеческой жизни, характеризующийся увеличением продолжительности жизни с сохранением физических и когнитивных способностей. Долгожителями считаются люди, достигшие возраста, существенно превышающего средний показатель продолжительности жизни. Представители данной группы населения мира устойчивы к распространенным социально значимым возраст-ассоциированным заболеваниям. Однако примечательно и то, что в условиях носительства одного или нескольких широко распространенных патологий долгожители обладают повышенной выживаемостью [1], что может свидетельствовать о наличии определенных адаптационных эндогенных механизмов.

Среди значимых для успешной адаптации организма молекулярно-генетических факторов особая роль отводится генам антиоксидантной системы и метаболизма токсичных соединений. Молекулы кислорода и его активные формы, постоянно образующиеся в клетках, являются индукторами большого количества метаболических процессов, протекающих в физиологических и патологических условиях жизнедеятельности организма [2]. Система метаболизма токсичных соединений, с появлением техногенных агентов взявшая на себя роль борьбы с ксенобиотиками, эволюционно приспособлена к элиминации из организма побочных продуктов обмена веществ. Таким образом, в рамках адаптационной гипотезы многофакторный характер феномена долголетия определяется сложной комбинацией генов системы эндо- и экзогенного метаболизма.

Для анализа характера взаимодействия компонентов геномной сети применяется целый ряд биоинформатических и статистических инструментов [3, 4]. Одной из программ, приспособленных для обработки полигенных данных, является APSampler, ранее раз-

работанная для поиска составных генетических биомаркеров методом Монте-Карло Марковскими цепями (MCMC) [5]. Данная программа включает набор функций, необходимый для поиска мультилокусных маркеров предрасположенности, в том числе, таких, как оценка ассоциаций для найденных сочетаний с помощью точного критерия Фишера, возможность проведения анализа ассоциации для комбинации конкретных принудительно выбираемых аллелей или генотипов. Это дает ей преимущество перед рядом схожих программ (BEAM, PLINK, MDR, LogicReg), предназначенных для полигенного анализа ассоциаций [6].

Цель работы заключалась в поиске мультилокусных маркеров долголетия в генах ферментов метаболизма свободных радикалов и токсичных соединений с использованием программы APSampler у этнических русских, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы. Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами проведения медико-биологических исследований с участием человека в качестве субъекта, закрепленными в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации [World Medical Association, 2013], и одобрено комитетом по биоэтике ИБГ УФИЦ РАН. Все обследуемые лица дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Выборка была сформирована из лиц, физически сохранных по сердечно-сосудистой и нервной системе. В отношении людей старшей возрастной когорты (лиц пожилого, старческого возраста и долгожителей), у которых возрастное изменение функций органов сердечно-сосудистой системы является, за редким исключением, практически нормой, допускалось наличие в анамнезе атеросклероза, кардиосклероза и церебросклероза. Для долгожителей разработана специальная позиция – так называемая «успешность», проявляющаяся в способности самообслуживания, физической активности, сохранности сознания.

Была сформирована выборка лиц, принадлежащих к этнической группе русских, проживающих на территории Республики Башкортостан, включающая 490 человек в возрасте от 1 до 102 лет. Общая выборка была дифференцирована на возрастные группы, выделенные на основе антропометрических, физиологических и биохимических особенностей онтогенеза [7].

В качестве материала для исследования использовали образцы ДНК, выделенные из 8 мл периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции.

Для исследования были выбраны 20 полиморфных маркеров генов антиоксидантной защиты, метаболизма глутатиона, метаболизма ксенобиотиков и факторов транскрипции, обеспечивающих редокс-гомеостаз: rs2070424**SOD1*, rs4880**SOD2*, rs662**PON1*, rs1050450**GPX1*, rs1695**GSTP1*, rs1131341**NQO1*, rs20417**PTGS2*, rs1208**NAT2*, rs1801133**MTHFR*, rs1045642**ABCB*, rs762551**CYP1A2*, rs4244285**CYP2C19*, rs3803304**AKT1*, rs11549465**HIF1A*, rs7493**PON2*, rs10098474**MSRA*, rs1001179**CAT*, rs1799895**SOD3*, rs1002149**GSR* и rs6721961**NFE2L2*. Аллельные варианты изучаемых полиморфных сайтов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей обработкой ампликонов эндонуклеазой рестрикции, с использованием аллель-специфичных праймеров или методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Условия проведения эксперимента, олигонуклеотидные последовательности для идентификации полиморфных локусов генов были подобраны с помощью приложения PrimerSelect 5.05 из пакета программы DNASTar Inc и базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Соответствие наблюдаемых частот генотипов в группе лиц среднего возраста теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга тестировали в программе Arlequin (V. 3.0). Мультилокусные генетические маркеры долголетия опре-

деляли с использованием метода Монте-Карло Марковскими цепями (MCMC) в программе APSampler (V.3.6.1); в качестве поправки на множественность сравнений (P_{cor}) использовался пермутационный тест (WinPepi V.11.39).

Результаты и обсуждение. В этнической группе русских установлено 11 мультилокусных маркеров, предрасполагающих к долголетию ($OR>1$), и 6 мультилокусных маркеров, носительство которых снижает шансы достижения долголетия ($OR<1$) (Табл. 1). Основными компонентами сочетаний, ассоциированных с долголетием, являются аллели *CAT*Т*, *GPX1*Т* и *MSRA*Т*, причем аллель *MSRA*Т* встречается в гомозиготном состоянии в сочетании с наиболее выраженными статистическими показателями ($OR=5.641$, $P=0.0004$, $P_{\text{cor}}=0.002$). Также часто встречающимися элементами этих сочетаний являются аллель *SOD2*С* и генотип *SOD1*А/А*. Вероятность стать долгожителем снижается у носителей составных генетических маркеров *PON2*С+CAT*С+NQO1*С+GSR*G* ($OR=0.278$, $P=0.004$, $P_{\text{cor}}=0.014$), *HIF1A*С+MSRA*Т+SOD1*G* ($OR=0.201$, $P=0.011$, $P_{\text{cor}}=0.04$), *CAT*С+NQO1*С+GSR*G* ($OR=0.282$, $P=0.011$, $P_{\text{cor}}=0.041$). Аллель *MSRA*Т*, встречающийся также в предрасполагающих к долголетию сочетаниях с генотипом *SOD1*А/А*, в комбинации с аллелем *SOD1*G* обладает противоположным эффектом ($OR=0.204$, $P=0.012$, $P_{\text{cor}}=0.041$).

Выявленные таким образом мультилокусные паттерны долголетия включают гены ферментов, участвующих в метаболизме активных форм кислорода первого и второго этапов, а также токсичных соединений эндогенной и экзогенной природы. Так, подавляющее число исследований роли ферментов супероксиддисмутаз (SOD) в патогенезе различных заболеваний и старческих процессов свидетельствует о снижении супероксидазной активности при сопровождающихся развитием окислительного стресса патологиях [8]. Среди этнических русских, достигших долголетия, наблюдается повышение частоты протективного в отношении ряда возраст-зависимых заболеваний генотипа *SOD1*А/А*. Миссенс-мутация в гене *SOD2* (116T>C, rs4880) обуславливает изменение вторичной структуры сигнального пептида и тем самым дестабилизирует его альфа-спиральный участок, что влияет на скорость переноса фермента из цитоплазмы в митохондрии и может приводить к абсолютному или относительному локальному дефициту фермента [9]. Показано, что активность *SOD2* существенно выше у носителей аллеля *SOD2*С*. По нашим данным, аллель *SOD2*С*, реализующий вариант фермента с высокой эффективностью в отношении защиты клетки от активных форм кислорода, ассоциирован с долголетием. Метионинсульфоксидредуктаза А (MSRA) относится к семейству ферментов, разрушающих активные формы кислорода. Восстанавливая белки с окисленным метионином, фермент играет большую роль в репарации белков при старении и при воздействии на организм агрессивных экологических факторов. Высказано предположение, что фермент MSRA играет важную роль в процессах старения [10]. В нашем исследовании установлена выраженная ассоциация с долголетием аллеля *MSRA*Т*. Также в данном исследовании получены интересные результаты по функциональному ДНК-маркеру rs1001179 гена каталазы (CAT). Аллель *CAT*Т* ассоциирован с низким уровнем активности фермента в эритроцитах [11], что увеличивает риск развития оксидативного стресса. Действительно, среди пожилого контингента наблюдается рост частоты аллеля *CAT*С*, ассоциированного с нормальной активностью каталазы, однако к старческому возрасту и у долгожителей вектор изменения частот меняется. Таким образом, аллель *CAT*Т* ассоциирован с долголетием. Вовлеченность генов глутатионового обмена в процессы, связанные с выживаемостью, адаптацией и долголетием, объясняется их широким функциональным спектром. Помимо антиоксидантной функции, они участвуют в метаболизме ксенобиотиков, активируя их биотрансформацию. Аллель rs1050450*Т гена *GPX1* отвечает за более низкую ферментативную активность продукта и выступает рисковым в отношении развития ряда возраст-ассоциированных заболеваний [12]. В нашем исследовании наблюдается снижение вероятности обнаружения генотипа, гомозиготного по аллелю *GPX1*Т*, среди долгожителей русской этнической принадлежности.

Таким образом, мы определили мультилокусные маркеры долголетия у русских, жителей Республики Башкортостан. Выявлены вероятные генные сети, участвующие в формировании стабильного высокоадаптивного фенотипа, позволяющего избежать возрастных патологий или минимизировать их негативное влияние.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и АНА (Грант № 19-54-40007) и мегагрантом Правительства Российской Федерации (№ 075-15-2021-595).

Литература

1. Maier H., Jeune B., Vaupel J. W. Exceptional lifespans // Springer Nature. 2021. С. 344.
2. Новиков В. Е., Левченкова О. С., Пожилова Е. В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014. Т. 12. №. 4.
3. Пономаренко И.В. Использование метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) и его модификаций для анализа ген-генных и генно-средовых взаимодействий при генетико-эпидемиологических исследованиях (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований. 2019. Т. 5. №. 1. DOI: 10.18413/2313-8955-2019-5-1-0-1
4. Полоников А. В., Клесова Е. Ю., Азарова Ю. Э. Биоинформатические инструменты и интернет-ресурсы для оценки регуляторного потенциала полиморфных локусов, установленных полногеномными ассоциативными исследованиями мультифакториальных заболеваний (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований. 2021. Т. 7. № 1. С. 15-31. DOI: 10.18413/2658-6533-2020-7-1-0-2.
5. Favorov A. V., Andreewski T. V., Sudomoina M. A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // Genetics. 2005. V. 171. №. 4. P. 2113-2121. DOI: 10.1534/genetics.105.048090
6. Lvovs D., Favorova O. O., Favorov A. V. A polygenic approach to the study of polygenic diseases // Acta Naturae (англоязычная версия). 2012. V. 4. №. 3 (14). P. 59-71.
7. Хрисанфова Е.Н. Основы геронтологии (Антропологические аспекты). М.: Владос, 1999. – 151 с.
8. Lewandowski Ł., Kepinska M., Milnerowicz H. The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases // European journal of clinical investigation. 2019. V. 49. №. 1. P. e13036. DOI: 10.1111/eci.13036
9. Колесникова Л., Баирова Т. А., Первушина О. А. Гены ферментов антиоксидантной системы // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. Т. 68. №. 12.
10. Oien D.B., Moskovitz J. Genetic regulation of longevity and age-associated diseases through the methionine sulfoxide reductase system // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.016>
11. Forsberg L., Lyrenas U., De Faire R., Mortgenstern A. A common functional C-T substitution in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels // Free Radical Biol Med 2001. V. 30. P. 500–505. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00487-1)

12. Ravn-Haren G., Olsen A., Tjønneland A. et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study // Carcinogenesis. 2006. Т. 27. №. 4. С. 820-825.

Таблица 1. Сочетания аллелей/генотипов, ассоциированные с возрастом в этнической группе русских, полученные с помощью алгоритма APSampler

№	Сочетание	Долгожители	Средний возраст	OR	95% CI	P	P _{кор}
		p, %					
1	CAT*T+MSRA*T/T+GPXI*T	29.730	6.977	5.641	2.254-14.114	4x10 ⁻⁴	0.002
2	HIF1A*C+MSRA*T+SOD1*A/A	92.105	69.189	5.195	1.534-17.592	0.002	0.006
3	CAT*T+MSRA*T+GPXI*T+GSTP1*A	37.838	14.535	3.579	1.627-7.872	0.002	0.006
4	CAT*T+MSRA*T+GPXI*T+SOD2*C	32.432	11.243	3.789	1.640-8.757	0.002	0.007
5	CAT*T+GPXI*T/C+GSTP1*A	36.842	15.166	3.263	1.528-6.970	0.003	0.011
6	MSRA*T+SOD1*A/A	92.105	70.588	4.861	1.435-16.471	0.003	0.012
7	CAT*T+MSRA*T+GPXI*T	37.838	16.279	3.130	1.438-6.815	0.004	0.018
8	CAT*T+GPXI*T/C+SOD2*C	31.579	12.500	3.231	1.455-7.176	0.005	0.018
9	CAT*T+GPXI*T/C	36.842	16.509	2.950	1.390-6.259	0.005	0.019
10	SOD1*A/A+SOD2*T	79.070	60.251	2.492	1.144-5.432	0.013	0.044
11	MSRA*T/T+GPXI*C+GSTP1*A	59.459	37.968	2.396	1.167-4.921	0.013	0.046
12	PON2*C+CAT*C+NQO1*C+GSR*G	60.000	84.354	0.278	0.118-0.654	0.004	0.014
13	PON2*C+NQO1*C+GSTP1*G	28.125	53.503	0.340	0.148-0.781	0.007	0.028
14	HIF1A*C+MSRA*T+SOD1*G	5.263	21.622	0.201	0.047-0.873	0.011	0.040
15	MSRA*T+GSR*G+SOD1*G	5.263	21.622	0.201	0.047-0.873	0.011	0.040
16	CAT*C+NQO1*C+GSR*G	73.333	90.686	0.282	0.111-0.721	0.011	0.041
17	MSRA*T+SOD1*G	5.263	21.390	0.204	0.047-0.885	0.012	0.041

Примечание. p – частота найденных сочетаний в возрастных группах, OR – показатель соотношения шансов наступления события, CI_{OR} – 95% доверительный интервал OR, P – уровень значимости, P_{кор} – уровень значимости после введения поправки на множественность сравнений.

Polygenic analysis of genetic markers of longevity using the APSampler program

V.V. Erdman¹, I.A. Tuktarova¹, K.V. Danilko², Timasheva Y.R.^{1,2}, T.V. Viktorova², Nasibullin T.R.¹

¹ *Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences
71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

² *Bashkir State Medical University
3 Lenina Str., 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

**Email: danivera@mail.ru*

Multilocus markers of longevity have been established in the ethnic group of Russians, residents of the Republic of Bashkortostan, for some genes involved in adaptation. The key genes of the identified polygenic clusters encode enzymes involved in the metabolism of reactive oxygen species of the first and second stages, as well as toxic compounds of endogenous and exogenous nature.

Key words: longevity, genetic polymorphism, multilocus analysis, APSampler, adaptation, genes for enzymes of metabolism of free radicals and toxic compounds

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами на содержание пролина и транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при стрессе

© Яруллина Л.Г.¹, Заикина Е.А.^{1*}, Цветков В.О.², Бурханова Г.Ф.¹, Черепанова Е.А.¹, Сорокань А.В.¹, Марданшин И.С.³, Калацкая Ж.Н.⁴, Балюк Н.В.⁴

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Россия, Уфа, 450054, проспект Октября, 71.

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет» Россия, Уфа, 450076, ул. Заки Валиди, 32.

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Россия, Уфа, 450059, ул. Рихарда Зорге, 19.

⁴Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купрезича НАН Беларуси» Беларусь, Минск, 220072, ул. Академическая, 27.

*Email: evisheva@yandex.ru

Исследовано влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами на содержание пролина и транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* при недостатке влаги. Растения, выращенные из микроклубней сорта Ранняя Роза, опрыскивали суспензией *B. subtilis* и смесью бактерий с СК, ЖК, СК + ЖК. Через 3 дня после обработки растения инфицировали *P. infestans* и культивировали в условиях засухи. Выявлено снижение степени развития *P. infestans* на листьях при обработке *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК, которое коррелировало с повышением содержания пролина и уровнем экспрессии генов PR-белков.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, пролин, экспрессия генов

В естественных условиях возделываемые культуры одновременно или последовательно подвергаются воздействию стрессовых факторов различной природы. В этой связи наиболее перспективными представляются микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов. Основной экологически чистых препаратов для защиты растений от биотических и абиотических стрессов являются стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) [1-2].

Среди абиотических факторов, формирующих продуктивность растений, наиболее важным является наличие воды [3]. Рост и развитие картофеля, а также урожайность сильно зависят от влажности почвы. У картофеля эта зависимость выражена гораздо

сильнее, чем у других видов сельскохозяйственных культур [4]. Известно, что ризобактерии могут значительно повысить засухоустойчивость растений [5-6].

Считается, что обработка растений СРРБ способствует развитию индуцированной системной устойчивости (ИСУ), опосредованной действием жасмоновой кислоты, маркером развития которой является индукция экспрессии защитного белка PR-6 [8]. Однако показано, что формирование устойчивости пшеницы к патогенам под действием бактерий рода *Bacillus* может развиваться и через салицилатный сигналинг по типу системной приобретенной устойчивости (СПУ), маркером развития которой служит индукция экспрессии защитного белка PR-1 [7].

Показано, что экзогенно применяемая салициловая кислота, помимо повышения устойчивости к патогенам, повышает устойчивость растений к ряду физиологических стрессов [8], аналогичные данные были получены при обработке жасмонатом [9]. Таким образом, значительный интерес представляет выяснение механизмов индуцирования устойчивости растений к патогенам и абиотическим стрессам под действием бактерий рода *Bacillus* в комплексе с сигнальными молекулами.

Цель работы – изучение влияния бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с СК и ЖК на содержание пролина и транскрипционную активность PR-генов при заражении *Phytophthora infestans* и засухе.

Материалы и методы. В опытах использовали растения картофеля *Solanum tuberosum*, выращенные из микроклубней восприимчивого сорта Ранняя роза. Клубни высаживали в емкости с грунтом (TerraVita). Растения выращивали на светоплощадке с фотопериодом 16 ч (освещенность 8000–10000 люкс) при температуре 20–22 °С.

На 15-е сутки после прорастания растений, часть из них опрыскивали суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д (10^8 клеток / мл) и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖК (10^{-7} М) или СК (10^{-6} М) + ЖК (10^{-7} М). Контрольные опрыскивали 5 мл дистиллированной воды на 1 растение. На 3-и сутки после инокуляции *B. subtilis* 26Д растения опрыскивали 5 мл 1×10^5 спор / мл суспензии возбудителя фитофтороза *P. infestans*. В качестве контроля использовали растения, не инокулированные бактериями и не инфицированные фитофторой.

Дефицит влаги создавали за счет сокращения полива. При появлении видимых симптомов засухи (увядание растений) через 7 дней после заражения *P. infestans* (влажность почвы при этом составляла $40\% \pm 5$ от полной влагоемкости) [10] определяли содержание пролина в листьях. Часть листьев каждого варианта растений растирали в жидком азоте для выделения РНК.

О развитии болезни судили по проценту пораженной площади от общей площади листовой пластинки на 7-е сутки после заражения растений *P. infestans*. Листья фотографировали, полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (NIH, США).

Определение содержания пролина. Навеску растений заливали 2.5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки помещали в водяную баню, которую затем доводили до кипения, после чего пробирки вынимали и охлаждали. Для приготовления реагента нингидрина 1.25 г нингидрина растворяли путем нагревания в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6М H_3PO_4 , а затем охлаждали. Пробирки, содержащие 2 мл холодного образца, 2 мл реагента нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа, затем охлаждали. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре при 522 нм. Концентрацию пролина определяли с использованием ранее полученной калибровочной кривой:

навески пролина 10, 20, 30, 40, 50, 60 мкг растворяли в 2 мл 3% сульфосалициловой кислоты, измеряли на Perkin Elmer LS 55 (США) при 522 нм, и строили кривую концентрации. Содержание пролина в образцах рассчитывали по формуле: $A = N \times V / P$, где A - концентрация пролина, N - значение по калибровочной кривой, V - объем разведения, мл, P - масса образца, грамм.

Определение транскрипционной активности генов PR-белков. РНК выделяли из растений с помощью тризола (Molecular Research Center, Inc., США). Для получения кДНК на основе мРНК исследуемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы M-MuLV согласно протоколу поставщика. Анализ накопления транскриптов генов PR-1 (номер GenBank AY050221), PR-6 (номер GenBank JX683427) и PR-9 (номер GenBank M21334) проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени. кДНК разводили в пять раз и использовали непосредственно в качестве матрицы для количественной ПЦР (qPCR). Количественная ПЦР проводилась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием N', N'-диметил-N-(4 - ((E) - (3-метил-1,3-бензотиазол-2-илиден) метил) -1-фенилхинолин-1-иум-2-ил) -N-пропилпропан-1,3-диамина (SYBR GreenI) (Synthol, Россия) на приборе CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, США). Программа qPCR: 50 °С в течение 2 мин; 95 °С в течение 10 мин; 40 циклов при 95 °С в течение 15 с и при 60 °С в течение 1 мин. Каждую количественную ПЦР проводили в трех повторностях. После заключительного цикла ПЦР был проведен анализ кривой плавления для определения специфики реакции (при 95 °С в течение 15 секунд, 60 °С в течение 1 минуты и 95 °С в течение 15 секунд). Эффективность каждой пары праймеров была определена с использованием серии 10-кратных разведений кДНК для надежного определения кратных изменений. Изменения транскрипционной активности гена (оценка количества копий мРНК для каждого гена) проводили относительно эталонного гена *St_act* («ген домашнего хозяйства», актин, номер GenBank X55749) с использованием программного обеспечения «CFX Connect Real-Time System» (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка. Эксперименты включали 5 биологических повторностей для биохимических показателей и 15 – для транскрипционной активности. На гистограммах показаны выборочные средние и их 95%-ные доверительные интервалы. Различия исследуемых параметров анализировали с помощью теста Краскела – Уоллиса. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Результаты и их обсуждение. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на инфицирование растений картофеля *P. infestans* в условиях засухи. Сравнительный анализ степени пораженности фитофторозом листьев восприимчивого сорта картофеля при недостатке влаги выявил различия в скорости роста оомицета *P. infestans* в вариантах с инокуляцией бактериями и сигнальными молекулами (рис. 1). Так, в отсутствие обработки степень пораженности составила 64%, предварительная обработка *B. subtilis*, в том числе в сочетании с СК и ЖК, значительно снижала пораженность листьев. Предобработка *B. subtilis* в сочетании с ЖК оказала наиболее эффективное защитное действие (рис. 1). Ранее нами было показано, что обработка ЖК и *B. subtilis* 26Д снижают развитие *P. infestans* на клубнях картофеля [11].

Особенностью эндофитных бактерий является их способность воздействовать на рост растений непосредственно за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая и жасмоновая кислоты [12], индуцирующих неспецифическую активацию защитных механизмов растений. Системная индуцированная устойчивость, вызываемая СРРБ, эффективна против грибов, оомицетов, бактерий, вирусов и насекомых-вредителей.

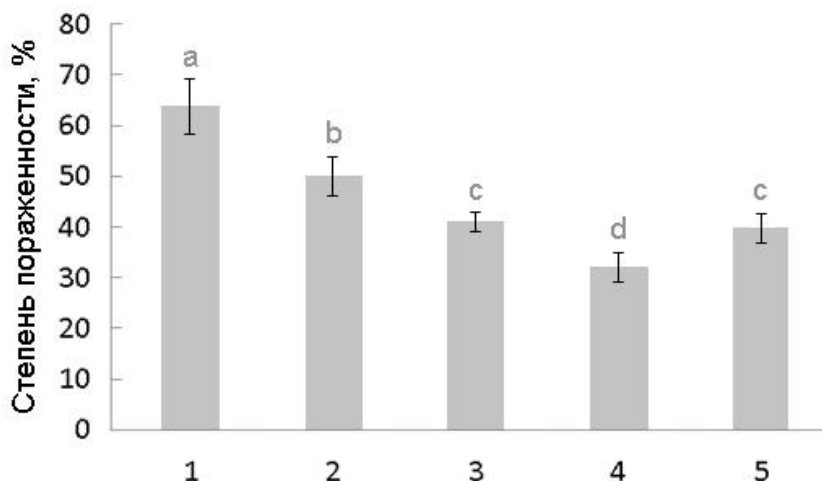


Рисунок 1. Влияние обработки бактериями *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК на пораженность листьев картофеля фитофторозом в условиях засухи. 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖК. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на содержание пролина. Исследования выявили антистрессовый эффект обработки бактериями *B. subtilis* 26Д на растениях картофеля в условиях засухи. Так, в растениях, обработанных *B. subtilis*, уровень пролина в листьях незараженных растений увеличивался в несколько раз (рис. 2). Сочетание бактерий с ЖК, но особенно с СК, снижало стимулирующее действие *B. subtilis* на уровень пролина в неинфицированных растениях. Однако, в варианте *B. subtilis* 26Д+СК+ЖК, содержание пролина было сопоставимо с уровнем растений, обработанных бактериями. Сходная тенденция влияния сочетания бактерий и сигнальных молекул на уровень пролина сохранялась и в инфицированных растениях (рис. 2).

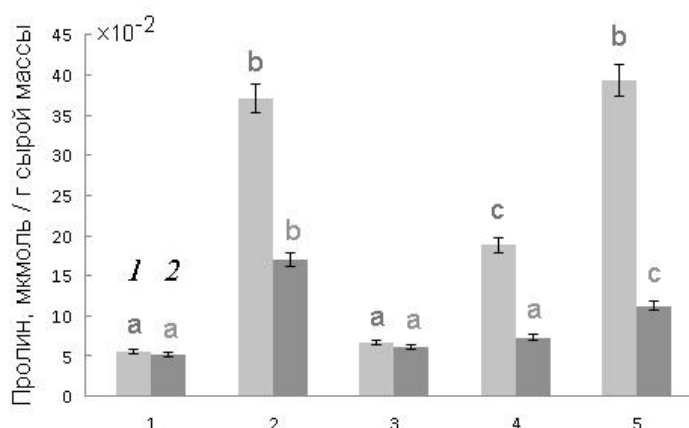


Рисунок 2. Влияние обработки бактериями *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК на содержание пролина в листьях картофеля при заражении *P. infestans* в условиях засухи. 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖК. 1 – незараженные, 2 – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Известно, что пролин играет роль осмопротектора при засухе, накапливаясь в цитозоле растительных клеток [13]. Защитный эффект пролина обусловлен его участием в стабилизации мембран, структуры белковых молекул и снижении уровня АФК [13].

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при заражении *P. infestans* в условиях засухи. Системная устойчивость растений к болезням, являющаяся неспецифической, основана на экспрессии многих защитных генов. Как видно на рис. 3, инфицирование и обработка *B. subtilis*, особенно в сочетании с сигнальными молекулами, стимулировали накопление транскриптов генов PR-1, PR-6 и PR-9 в растениях картофеля. Так ген PR-1 наиболее интенсивно экспрессировался у растений, обработанных бактериями в сочетании с СК. Обработка *B. subtilis* в сочетании с ЖК приводила к значительному увеличению уровня транскрипции гена PR-6 у неинфицированных и инфицированных растений по сравнению с контролем.

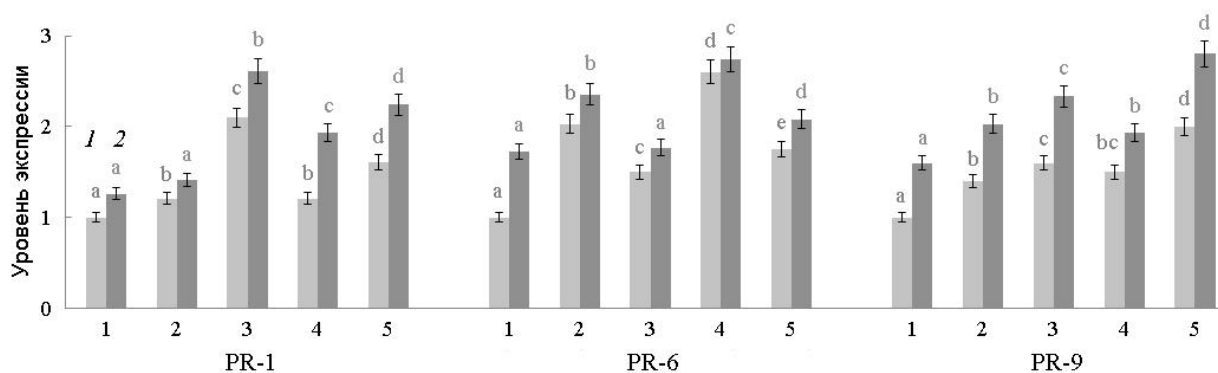


Рисунок 3. Влияние обработки бактериями *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК на уровень экспрессии генов защитных белков. 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖК. 1 – незараженные, 2 – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Следует обратить внимание, что обработка бактериями *B. subtilis* в отсутствие сигнальных молекул оказывала значительное влияние на повышение уровня экспрессии PR-1 и PR-6 у незараженных растений в условиях засухи. Комбинация бактерий с СК и ЖК в данном случае имела, как правило, меньший, а в некоторых случаях даже отрицательный эффект, например, экспрессия PR-6 снижалась в присутствии СК. У инфицированных растений, обработанных бактериями в сочетании с СК или ЖК, значительно повышалась экспрессия PR-белков. В неинфицированных растениях экспрессия PR-9 увеличивалась при обработке *B. subtilis* как в отсутствие, так и в комбинации с СК или ЖК, но комбинированный эффект СК и ЖК вызывал большее увеличение экспрессии PR-9. Ранее было показано, что ЖК может нейтрализовать способность *B. subtilis* 26Д стимулировать транскрипционную активность гена PR-9 в условиях нормальной влажности [12]. Супрессивный эффект совместной обработки *B. subtilis* 26Д + ЖК выражался в снижении транскрипции генов PR-2, PR-3 и PR-9 в растениях пшеницы по сравнению с растениями, обработанными только *B. subtilis* 26Д или ЖК. Следовательно, совместное влияние засухи и заражения патогеном приводит к дополнительным

изменениям транскрипционной активности PR-генов растений по сравнению с инфицированными растениями, выращенными в нормальных условиях. Полученные данные могут быть использованы для разработки биопрепаратов, обладающих комплексным защитным эффектом на растения в стрессовых условиях.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-516-00005, на оборудовании ЦКП “Биомика” и УНУ “Кодинк”.

Литература

1. Maksimov I.V., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Sarvarova E.R., Khairullin R.M. Plant growth-promoting bacteria in regulation of plant resistance to stress factors // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2015. V. 62. P. 715-726.
2. Verma P., Yadav A.N., Kumar V., Singh D.P., Saxena A.K. Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement // *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* / Eds. Singh D.P., Singh H.B., Prabha R. Singapore: Springer, 2017. P. 543-580.
3. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria // *Microbiological Research*. 2016. V. 184. P. 13-24.
4. Burton W.G. Challenges for stress physiology in potato // *American Potato Journal*. 1981. V. 58. P. 3–14.
5. Marasco R., Rolli E., Ettoumi B., Vigani G., Mapelli F., Borin S., Abou-Hadid A.F., El-Behairy U.A., Sorlini C., Cherif A., Zocchi G., Daffonchio D. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming // *PLoS One*. 2012. V. 7. No. 10. Article e48479.
6. Coleman-Derr D., Tringe S.G. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance // *Front Microbiol*. 2014. V. 5. P. 283.
7. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Jasmonic acid: biosynthesis, functions and role in plant development // *Series Plant Science Research and Practices* / Ed. Morrison L. USA: Nova Science Publishers, 2015. P. 33-66.
8. Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan' A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk. // *Appl Biochem Microbiol*. 2017. V. 53. No. 3. P. 346-352.
9. Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review // *Environmental and Experimental Botany*. 2010. V. 68. P. 14-25.
10. Chanda B., Xia Y., Mandal M.K., Sekine K.T., Gao Q.M., Selote D. Glycerol-3-phosphate, a critical mobile inducer of systemic immunity in plants // *Nat Genet*. 2011. V. 43. P. 421–427.
11. Lastochkina O.V., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // *Wheat Production in Changing Environments. Responses, Adaptation and Tolerance* / Eds. Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain A. Singapore: Springer, 2019. P. 579-6.

12. Maksimov I.V., Abizgildina P.P., Sorokan A.V., Burkhanova G.F. Regulation of peroxidase activity under the influence of signaling molecules and *Bacillus subtilis* 26D in potato plants infected with *Phytophthora infestans* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. V. 50. No. 2. P. 173-178.

13. Pireivatloum J., Qasimov N., Maralian H. Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. // Afr J Biotech. 2010. V. 9. P. 36-40.

Influence of *Bacillus subtilis* bacteria in combination with signaling molecules on proline content and transcriptional activity of PR-protein genes in potato plants under stress

Yarullina L.G.¹, Zaikina E.A.^{1*}, Tsvetkov V.O.², Burkhanova G.F.¹, Cherepanova E.A.¹, Sorokan A.V.¹, Mardanshin I.S.³, Kalatskaya J.N.⁴, Balyuk N.V.⁴

¹FGBUN Institute of Biochemistry and Genetics UFIC RAS, 71, Pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

²FSBEI HE Bashkir State University, 32, Zaki Validi str., Ufa, 450076, Russia

³FGBUN Bashkir Research Institute of Agriculture, 450059 Russia, Ufa, Zorge str., 19

⁴GNU Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich NAS of Belarus, 27, Akademicheskaya str., Minsk, 220072, Republic of Belarus

*Email: evisheva@yandex.ru

The effect of *Bacillus subtilis* bacteria in combination with salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids on the proline content and transcriptional activity of PR-protein genes in potato plants during *Phytophthora infestans* infection and drought was studied. Plants grown from microtubers of the Rannyaya Rosa cultivar were sprayed with a suspension of *B. subtilis* and a mixture of bacteria with SA, JA, SA + JA. 3 days after treatment, the plants were infected with *P. infestans* and cultivated under drought conditions. A decrease in the degree of *P. infestans* development on leaves was revealed upon treatment with *B. subtilis* in combination with SA and JA, which correlated with an increase in the proline content and the level of expression of PR-protein genes.

Key words: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, proline, gene expression

Научное издание

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОХИМИИ, ГЕНЕТИКИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ**

***Материалы III Всероссийской научной конференции
с международным участием
(21 – 23 сентября 2021 г.)***

*Лицензия на издательскую деятельность
ЛР № 021319 от 05.01.99 г.*

Подписано в печать 16.09.2021 г. Формат 60x84/16.
Усл. печ. л. 14,84. Уч.-изд. л. 15,48.
Тираж 300 экз. (1-й завод 28 экз.). Изд. № 60. Заказ 284.

*Редакционно-издательский центр
Башкирского государственного университета
450076, РБ, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.*

*Отпечатано на множительном участке
Башкирского государственного университета
450076, РБ, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.*

