

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

**X Всероссийский конгресс
молодых ученых-биологов
«Симбиоз-Россия-2017»**

Сборник тезисов

Казань, 25–28 октября 2017 г.

**Казань
2017**

УДК 575:577:579:616

ББК 5:75:74

М89

ОРГАНИЗАТОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ:

Институт фундаментальной медицины и биологии
ФГОАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Конференция проводится при финансовой поддержке:

ООО «Компания Хеликон»;

ООО «Диаэм»/Dia-M LLC;

ООО «Мерк»/ LLC "Merck"

М89 X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017». Сборник тезисов. (Казань, 25–28 октября 2017 г.) / под общ. ред. Т.В. Балтиной, Г.Г. Яфаровой. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – с.

В сборник включены материалы X Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия- 2017». В материалах собраны тезисы докладов студентов, аспирантов и молодых ученых в области биологии и представленные в виде докладов на секциях конгресса по различным биологическим направлениям, начиная от фундаментальных задач и заканчивая яркими прикладными работами. Работы сделаны на высоком методическом уровне, что говорит о наличии большой и достойной смены в научной биологической среде России. Материалы сборника отражают современное состояние соответствующих научных направлений и предназначены для студентов и преподавателей университетов, медицинских, педагогических и физкультурных учебных заведений, специалистов в области биологии.

Оглавление

Лекторий.....	4
Секция морфология клеточных и тканевых структур	8
Секция биомедицины.....	17
Секция микробиология и вирусология	65
Секция Общая биология.....	132
Секция Генетика. Молекулярная биология.....	156
Секция Физиология человека и животных. Биофизика.....	213
Секция биофизика	273
Секция Биохимия.	280
Секция Биотехнология.....	299
Школьная секция.....	327
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	336

Лекторий

УДК: 577.2

К. С. Усачев¹, Р. Х. Аюпов¹, И. Ш. Хусаинов^{1,2},

Ш. З. Валидов¹, М. М. Юсупов^{1,2}

¹ Казанский федеральный университет

² Страсбургский университет, IGBMC, Страсбург, Франция

k.usachev@kpfu.ru

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИБЕРНАЦИИ РИБОСОМ STAPHYLOCOCCUS AUREUS В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКА HPF

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) один из наиболее опасных патогенов для человека, вызывающий множество внебольничных и внутрибольничных инфекций. Метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA) является штаммом золотистого стафилококка, который обладает устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам, включающие в себя пенициллины (метициллин, диклоксациллин, нафциллин, оксациллин и т.д.) и цефалоспорины. Произшедшие за последнее десятилетие изменения в устойчивости золотистого стафилококка обуславливают необходимость новых противомикробных агентов. Одной из наиболее важных целей для антибиотиков является бактериальная рибосома – рибонуклеобелковая частица синтезирующая белок в клетке. Более 40% клинически используемых антибиотиков нацелены против активности рибосомы. Синтез белка имеет важное значение для всех живых клеток, и это одна из основных мишеней для клинического лечения бактериальных инфекций. Принцип действия многих антибиотиков заключается в их селективном ингибировании белоксинтезирующего аппарата бактериальных клеток, без нарушения работы клеток организма-хозяина и, следовательно, его рибосом.

В стрессовых условиях в клетках золотистого стафилококка происходит замедление белкового синтеза за счет того, что экспрессированные белки стационарной фазы такие как фактор инактивации рибосомы (hibernation promoting factor, HPF) связываясь с рибосомами образуют трансляционно не активный 100s димер. В этой фазе бактериальные клетки устойчивы к внешним стресс условиям, что обеспечивает их резистентность к антимикробным агентам.

С помощью метода криоэлектронной микроскопии была решена структура 70S рибосомы золотистого стафилококка с разрешением 3.8 Å, а также 100S димера рибосом, образующихся в присутствии стрессового белка SaHPF с разрешением 3.7 Å. Анализ полученных структур показал, что образование 100S димера рибосом происходит за счет связывания N-концевого домена белка SaHPF с активными центрами рибосомы, а C-концевой домен белка образует дополнительный белковый контакт между мономерами и связывается с C-концевым доменом белка SaHPF из второй рибосомы в димере. Структура C-концевого домена белка SaHPF, а также интерфейс димера белков были решены методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Таким образом методами структурной биологии с высоким разрешением был показан видоспецифичный механизм формирования димеров рибосом золотистого стафилококка в присутствии белка SaHPF, что открывает возможности для улучшения селективности противомикробных препаратов для лечения стафилококковой инфекции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-14-10014.

Научный руководитель – канд. биол. наук, М. М. Юсупов

Л.И. Фахранурова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
г. Пущино*

LFakhranurova@gmail.com

РАЗРАБОТКА НОВОГО ТИПА БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПРОФИЛАКТИКУ ВОЗРАСТНЫХ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ЗРЕНИЯ

Одной из довольно частых причин ухудшения зрения и развития слепоты у людей старшего возраста является возрастная макулярная дегенерация сетчатки (макулодистрофия; ВДМ). Это хроническое неизлечимое заболевание, в основе которого лежат дегенеративные процессы.

В последнее время к рискам (environmental risks) возникновения макулодистрофии относят излучение в синей части спектра. Проведенное нами исследование показало, что синий свет (также как и УФ) значительно ингибирует жизнеспособность и митохондриальную активность пигментного эпителия сетчатки. Также облучение синим светом вызывало изменение динамики экспрессии генов, отвечающих за апоптоз, некроз и аутофагию.

В настоящее время разработаны методы «лечения» (а правильнее сказать методы остановки развития) дистрофических состояний, основанные на применении специального оборудования в амбулаторных условиях и не обеспечивают в полной мере восстановления функциональной активности макулы. Это делает актуальной задачу разработки новых неинвазивных амбулаторных (повседневных) методов профилактики и лечения ВДМ. Мы разрабатываем светопреобразующие материалы, которые должны одновременно защищать структуры глаза от вредного света в УФ, фиолетовом, синем диапазонах и при этом увеличивать долю

биостимулирующего света в оранжево-красном и/или ближнем инфракрасном диапазонах. Эффективность облучения красного и инфракрасного света при дистрофических изменениях в сетчатке была показана ранее нами в предыдущих работах. Мы предполагаем, что данные материалы позволят без значимого искажения зрительного восприятия глаза избирательно повысить относительную спектральную плотность света именно в тех диапазонах длин волн, в которых наблюдается лечебно – профилактическое действие света на сетчатку глаза человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и правительства Московской области в рамках научного проекта № 17-44-500740 и при поддержке гранта Президента МК-1880.2017.7.

УДК 591.8

Г.П. Беляев

Казанский федеральный университет

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова,

г. Казань

gregoir4@gmail.com

**ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ПЕКТИНА С ЖЕЛЕЗОМ И
КАЛЬЦИЕМ НА СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ
ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕЗЁНКИ КРЫС ПРИ
ФЕНИЛГИДРАЗИНОВОЙ АНЕМИИ**

Анемия – клинико-гематологический синдром, обусловленный снижением концентрации гемоглобина или количества эритроцитов в единице объема крови. Данный синдром распространен абсолютно во всех возрастных группах, особенно среди детей, беременных и пожилых людей. В настоящее время активно ведутся разработки новых лекарственных средств на основе растительного сырья, которые характеризуются меньшей токсичностью и лучшей переносимостью организмом человека. Одним из таких препаратов является инновационное противоанемическое средство – комплекс пектина с железом и кальцием (натрий-, кальций-, железо-полигалактуронат).

В нашей работе нами проведено изучение гистологического строения селезёнки крыс, сравнение эффективности действия полигалактуроната и широко используемого французского препарата «Тотема». Эксперименты были проведены на 24 крысах, у которых, в качестве модели, была индуцирована фенилгидразиновая анемия. В исследовании использовались стандартные гистологические методы, окраска гематоксилин-эозином, по Перльсу. Для оценки морфометрических показателей использовался микроскоп Nikon

H550S с программным обеспечением NIS-Elements Basic Research, статистическая обработка данных осуществлялась в программе Past Ver 3.11. Работа выполнена в рамках Госконтракта № 14.N08.12.1042 (программа «Фарма-2020»).

В ходе исследования эффективность препаратов определялась по площади выявления гемосидерина в красной пульпе селезёнки крыс в процентах от общей площади среза. Показано, что действие комплекса пектина с железом и кальцием и противоанемического препарата «Тотема» на структурно-морфологические изменения селезёнки крыс аналогично и приводит к снижению области детекции гемосидерина ($20.19 \pm 2.18\%$ и $21.44 \pm 1.64\%$ соответственно) в сравнении с контрольной группой ($29.25 \pm 1.92\%$), что подтверждает эффективность данных средств. Выяснено, что полигалактуронат с добавлением аскорбиновой кислоты не оказывает никакого эффекта ($29.27 \pm 2.6\%$). Данные результаты были подтверждены при помощи статистической обработки данных площадей выявления гемосидерина в красной пульпе селезёнки крыс.

Определено соотношение площадей основных зон селезёнки крыс (белая пульпа, маргинальная зона, красная пульпа) в процентах от общей площади среза после индуцирования фенилгидразиновой анемии. Площади красной и белой пульпы, маргинальной зоны селезёнки после введения полигалактуроната ($56.62 \pm 3.18\%$, $20.68 \pm 1.8\%$, $22.7 \pm 2.09\%$), полигалактуроната в смеси с аскорбиновой кислотой ($53.23 \pm 7.2\%$, $23.78 \pm 3.63\%$, $22.99 \pm 3.65\%$) и препарата «Тотема» ($59.91 \pm 2.74\%$, $17.45 \pm 1.67\%$, $22.64 \pm 1.88\%$) статистически значимо не отличаются от крыс контрольной группы ($57.99 \pm 3.32\%$, $20.73 \pm 2.14\%$, $21.29 \pm 1.95\%$).

Научные руководители – А.Б. Выштакалюк, д-р биол. наук, А.Г. Порфирьев, канд. биол. наук, доцент.

УДК 612.825

А. А. Мельникова¹, Н. И. Арнст¹, С. В. Кузнецова², Н. С. Липачев¹, А. А. Кочнева¹, Н. М. Шайхутдинов¹, А. А. Расческов¹, А. С. Двоеглазова¹, М. М. Мавликеев¹, Ю. Н. Осин², А. П. Киясов¹, М. Н. Павельев³

¹*Институт Фундаментальной Медицины и Биологии КФУ,*

²*Междисциплинарный центр аналитической микроскопии КФУ,*

³*Центр Нейронаук, Университет Хельсинки, Финляндия*

melnikova1995@yandex.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА ГАМКЕРГИЧЕСКОГО СИНАПСА С ПЕРИНЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТЬЮ

Некоторые субпопуляции нейронов коры головного мозга, в том числе интернейроны 4 и 6 слоев коры окружены перинейрональной сетью. Перинейрональная сеть представляет собой высокоструктурированный тип внеклеточного матрикса центральной нервной системы. Перинейрональная сеть создает микроокружение синаптических бутонов ГАМКергических синапсов и участвует в регуляции синаптической передачи, пластичности. ГАМКергические синапсы выполняют важные функции в поддержании баланса возбуждения и торможения в здоровом мозге, а также в патогенезе ряда заболеваний ЦНС, в том числе эпилепсии. Молекулярный состав перинейрональных сетей, структурная и функциональная роль отдельных составляющих, в том числе их влияние на поведение животных были в существенной степени изучены в течение последних 10 лет. В то же время, её морфология остается практически неизученной. В частности, структура комплекса ГАМКергического синапса с перинейрональной сетью представляет интерес в связи с механизмами пластичности синапса, пространственного распределения нейротрофных факторов, регулирующих синаптическую передачу, и др. В настоящей работе

проведено исследование морфологии комплекса гамкергического синапса с перинейрональной сетью методом конфокальной микроскопии высокого разрешения на криосрезах соматосенсорной коры головного мозга взрослых мышей. Агглютинин из *Wisteria floribunda* использован как маркер хондроитинсульфат протеогликанов перинейрональных сетей. Поликлональное антитело анти-VGAT использовано как пресинаптический маркер ГАМКергических синапсов. Конфокальная микроскопия с размером вокселя 100x100x200 нм проводилась на перинейрональных сетях нейронов 4-го слоя соматосенсорной коры мозга взрослой мыши. В настоящей работе предложена группа методов количественного анализа изображений, позволяющих изучение формы, размера и ряда морфологических параметров комплекса ГАМКергического синапса с перинейрональной сетью, а также их вариабельности.

Научный руководитель – М.Н. Павельев, кандидат биологических наук.

УДК 576.08

Л.А. Сульдина, А.Е. СорокинаОшибка! Источник ссылки не найден., Е.А. Васькова

Институт цитологии и генетики, Новосибирск
suldinalubov@gmail.com

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ КРЫСЫ

Плюрипотентные клетки, способные к дифференцировке в производные всех зародышевых листков, в настоящее время повсеместно используются в фундаментальных биомедицинских исследованиях. Наиболее широко применяются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), полученные из внутренней клеточной массы

бластоцист, а также индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), репрограммированные к недифференцированному состоянию из соматических клеток взрослого организма. ИПСК являются своеобразным аналогом ЭСК, созданным искусственно в условиях *in vitro* и имеющим аналогичные маркеры плюрипотентности. По сей день актуальным остается вопрос о сходствах и различиях между этими двумя типами плюрипотентных клеток. При этом некоторые исследователи показали, что ЭСК и ИПСК отличаются по эпигенетическим характеристикам и способности к развитию, тогда как другие авторы утверждают, что различия между линиями одного и того же типа более выражены, чем между разными типами клеток. Нами впервые проведен детальный сравнительный электронномикроскопический и морфометрический анализ организации изогенных ЭСК и ИПСК крысы.

В своей работе мы исследовали структурную организацию трех линий ЭСК (RES12, RES27 и RES28) и двух линий ИПСК (MR и QV), которые были получены от крыс линии WAG. Ранее нами было показано, что клетки всех линий экспрессируют маркеры плюрипотентного состояния и дифференцируются в производные всех зародышевых листков. Установлено, что все плюрипотентные клетки крысы имеют округлую форму, содержат крупные ядра, часто с инвагинациями оболочки, и небольшое количество обедненной органеллами цитоплазмы. Было обнаружено, что в клетках присутствуют три типа митохондрий, отличающихся по морфологии: с плотным матриксом и расширенными кристами, со светлым матриксом и узкими кристами, а также органеллы с матриксом средней плотности с узкими и расширенными кристами. Согласно литературным данным, эти органеллы могут отличаться по метаболической активности. В цитоплазме встречаются узкие длинные цистерны ЭПР, стопки узких диктиосом АГ, липидные капли, крупные и мелкие скопления гликогена. Морфометрический анализ показал, что разные линии плюрипотентных клеток крысы

имеют сходное ядерно-цитоплазматическое соотношение и среднюю удельную длину цистерн ЭПР, но отличаются по ряду других показателей. Наибольшие различия заметны в средней численной плотности митохондрий в клетках, так линия QV имеет в 2 раза большую численную плотность митохондрий. В линиях QV и RES28 средняя объемная плотность светлых митохондрий снижена приблизительно в 2 раза, а средняя объемная плотность скоплений гликогена увеличена по сравнению с другими линиями. В линии RES27 наименьшее количество клеток содержат гликоген, а в линии QV большинство клеток содержат только крупные его скопления. Эти данные демонстрируют, что линии RES28 (ЭСК) и QV (ИПСК) заметно отличаются от RES12, RES27 (ЭСК) и MR (ИПСК) по средней объемной и численной плотности митохондрий, а также средней объемной плотности и распределению скоплений гликогена. Это позволяет сделать вывод, что различия между линиями плюрипотентных клеток более выражены, чем между разными типами, ЭСК и ИПСК, что согласуется с литературными данными.

Научный руководитель – Е.В. Киселева, канд. биол. наук.

УДК 615.244

Л. Р. Хасаншина

Казанский федеральный университет

leylaha96@gmail.com

**ВЛИЯНИЕ СОКРИСТАЛЛОВ КСИМЕДОНА
С АСКОРБИНОВОЙ, П-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ И ЯНТАРНОЙ
КИСЛОТАМИ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ**

В настоящем сообщении приведены результаты исследований по установлению влияния сокристаллов Ксимедона с аскорбиновой (шифр 29Д), п-аминобензойной (шифр 34Д) и янтарной кислотами

(шифр 27Д) на морфологические изменения печени крыс при токсическом гепатите, индуцированном четыреххлористым углеродом.

Повреждения печени вызывают серьезные нарушения в регуляции обмена веществ, детоксикации и антимикробной защиты. Основную роль в лечении играет восстановление поврежденных клеток печени. Для ускорения процесса используются препараты-гепатопротекторы. В настоящее время фармакологические средства данной группы обладают, в основном, эффектом плацебо. Большинство из препаратов, представленных на отечественном рынке, являются импортными и дорогостоящими. Поэтому поиск и изучение свойств новых отечественных препаратов-гепатопротекторов является актуальным.

С целью тестирования гепатопротекторной активности исследуемых препаратов изучалось их влияние на жировую инфильтрацию печеночной ткани крыс при токсическом гепатите путем анализа гистологических срезов. Также исследовалось влияние препарата 29Д на пролиферативную активность клеток печени путем анализа общего количества гепатоцитов и двоядерных клеток, а также на количество ретикулоэндотелиальных клеток и патологически измененных гепатоцитов на единицу площади ткани. В качестве препарата сравнения был взят Тиотриазолин как эталон эффективности воздействия гепатопротекторного лекарственного средства.

Показано, что при применении препаратов 27Д, 29Д и 34Д наблюдается уменьшение доли ткани печени с жировой инфильтрацией на модели токсического гепатита, индуцированного у крыс четыреххлористым углеродом. Из исследуемых соединений 27Д, 29Д и 34Д лишь препарат 29Д увеличивает пролиферативную активность клеток печени. Обнаружено, что на 11-й день после затравки четыреххлористым углеродом применение препарата 29Д в различных дозах и препарата Тиотриазолин в целом не вызывает

достоверного уменьшения количества ретикулоэндотелиальных клеток и патологически измененных гепатоцитов. На 21-й день после затравки во всех группах наблюдается уменьшение количества некрозов, а также клеток с баллонной и гидропической дистрофией по сравнению с 11-ым днем.

Работа выполнена в лаборатории ХБИ Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН при финансовой поддержке РФФИ грант № 14-50-00014.

Научные руководители – д-р биол. наук, проф. В.В. Зобов; д-р биол. наук А.Б. Выштакалюк.

УДК 576.314.3

Ш. И. Чалабов

Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

biowulf05@gmail.com

РЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ МЕМБРАН НА ГИПОТЕРМИЮ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ВИТАМИНАМИ-АНТИОКСИДАНТАМИ С И Е

Исследования выполненные в нашей лаборатории показали, что кратковременная гипотермия 30°C (умеренная гипотермия) и ее пролонгирование в течение 1,5 ч приводит к существенному нарушению морфологического состава эритроцитов, а также повреждению структуры мембраны, что может быть причиной их внутрисосудистого гемолиза. В данной работе проведены исследования возможности коррекции морфологических характеристик эритроцитов, а также защиты ее мембраны путем курсового совместного введения витаминов С и Е. Общую гипотермию у крыс вызывали путем наружного охлаждения. Температуру тела снижали до 30°C (кратковременная гипотермия), а затем пролонгировали ее в течение 1,5 ч. Витамины С и Е вводили

внутрибрюшинно в течение 7 дней. Морфология эритроцитов и топография поверхности их мембраны изучены с помощью оптического и атомно-силового микроскопов.

В контроле подавляющее количество эритроцитов являются дискоцитами. После 1,5 ч гипотермии количество дискоцитов в крови существенно снижается. Количество плоских клеток увеличиваются по сравнению с контролем, а 41% всех клеток представлены эхиноцитами, появляются другие измененные формы клеток, существенно увеличивается также количество макроцитов. Совместное курсовое введение витаминов С и Е приводит к нормализации морфологического состава эритроцитов. После гипотермии на фоне витаминов большинство клеток являются дискоцитами и нормоцитами, количество эхиноцитов и плоских клеток снижено до уровня контрольных животных.

Анализ топографии поверхности эритроцитов выявил, что у контрольных крыс наблюдаются неровности, высота которых составляет 2-4 нм. После 1,5 ч гипотермии неровности на мембране возрастают до 8-10 нм и появляются точечные повреждения – воронкообразные отверстия. Введение витаминов снижает неровности на поверхности мембран до 4-6 нм, а воронкообразные отверстия исчезают.

Приведенные выше материалы позволяют заключить, что при пролонгированной в течение 1,5 умеренной гипотермии наблюдается выраженный анизоцитоз и пойкилоцитоз, характеризующийся снижением уровня нормоцитов, дискоцитов, повышением уровня макро-, микроцитов, эхиноцитов и плоских клеток. Совместное введение витаминов С и Е препятствует появлению измененных форм эритроцитов и нарушений структуры мембраны, таким образом оказывая протекторное действие.

Научный руководитель – Н.К. Кличханов, д-р биол. наук, проф.

Секция биомедицины

УДК:616-092.18

И. А. Андрианова¹, А. А. Пономарева²

¹ *Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский
федеральный университет*

² *Казанский институт биохимии и биофизики, Российская
академия наук*

izabella_a@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МОНОЦИТОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Системная красная волчанка (СКВ) – это аутоиммунное заболевание, при котором поражаются многие органы и системы (суставы, почки, кожные покровы, центральная нервная система). СКВ в активной стадии сопровождается системным воспалением, которое проявляется повышенным уровнем аутоантител в крови, чаще всего антител к ДНК и другим ядерным компонентам клетки, образованием циркулирующих иммунных комплексов и активацией системы комплемента. Моноциты играют важную роль в процессе воспаления при СКВ и могут способствовать развитию тромбоза.

Целью работы было выявление ультраструктурных отличий моноцитов в крови больных СКВ от нормальных моноцитов.

Моноциты человека выделяли методом негативной иммуно-магнитной сепарации из фракции моноклеаров, полученных центрифугированием в градиенте фиколл-верографин. По данным проточной цитометрии после связывания меченых антител к антигену CD14, чистота моноцитарных препаратов составляла более 97%. По эксклюзии трипанового синего, 98% моноцитов были жизнеспособны. После фиксации и дегидратации, центрифугат клеток окрашивали тетроксидом осмия, заливали в эпоксидную смолу, делали ультратонкие срезы и подвергали трансмиссионной электронной микроскопии.

Были исследованы клетки, выделенные из крови 6 больных СКВ, в том числе 3 пациентов с высоким уровнем сывороточных антител к ДНК (более 200 МЕ/мл), 3 с низким уровнем антител к ДНК (менее 25 МЕ/мл), и 3 здоровых доноров. При исследовании ультраструктуры моноцитов было выявлено два типа патологически измененных клеток: 1) предположительно апоптотические клетки, которые характеризовались гладкой плазматической мембраной, электронно-плотной цитоплазмой, набухшими митохондриями с единичными кристами, концентрацией гетерохроматина у ядерной оболочки в форме полумесяцев, фрагментацией ядра; 2) предположительно некротические клетки, которые характеризовались гладкой плазматической мембраной, мелкими конденсированными митохондриями (электронно-плотный матрикс, светлое межкристиальное пространство), уплотнением гетерохроматина в виде глыбок в ядре. В крови больных СКВ доля апоптотических (19%, $p < 0,001$) и некротических (17%, $p < 0,001$) моноцитов была достоверно выше, чем у здоровых доноров (0% и 5%, соответственно). Важно отметить, что у больных СКВ с высоким титром антител к ДНК процент апоптотических (26%, $p < 0,01$) и некротических (20%, $p < 0,05$) клеток был достоверно больше, чем у больных СКВ с низким уровнем АТ к ДНК (6% и 10%, соответственно).

Полученные результаты указывают на глубокие структурные изменения моноцитов при СКВ, что подтверждает их вовлеченность в патогенез при аутоиммунной патологии. Взаимосвязь между уровнем антител к ДНК в крови и содержанием патологически измененных моноцитов у больных СКВ подтверждает роль антинуклеарных аутоантител в качестве модуляторов функционального состояния моноцитов, вызывающих их ускоренную гибель по механизму апоптоза и/или некроза.

Научный руководитель – Р. И. Литвинов, проф., д-р мед. наук.

УДК 576.33

О.О. Антипова¹, Я.И. Пигарева¹, В.Н. Колпаков¹, А.А. Гладков^{1,2},
А.С. Пимашкин¹

¹*Нижегородский государственный университет им. Н. И.
Лобачевского*

²*Нижегородская государственная медицинская академия*
a.little.strange96@gmail.com

МОДЕЛЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ В КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МИКРОФЛЮИДИКИ

Разработка новых современных методик лечения повреждений центральной нервной системы является важной задачей медицины. В работе представлена модель восстановления нейрональных связей в культуре нейрональных клеток с помощью методов микрофлюидики. Данный метод позволит создавать импланты с биоподобной структурой сети нейрональных клеток и разработать новые методы восстановления функциональных путей в нервной системе.

Материалы и методы

В работе используется микрофлюидный чип, состоящий из трех камер, соединенных последовательно ассиметричными микроканалами. В камерах культивировались диссоциированные клетки гиппокампа мыши (E18), их нейриты прорастали в микроканалы. Наблюдение за развитием морфологии сети производилось при помощи установки долговременного мониторинга Cell-IQ (Финляндия).

Результаты и обсуждение

Мы смоделировали восстановление повреждения нервной системы при помощи двухэтапной посадки и выращивания нейрональных культур в трёхкамерном микрофлюидном чипе. На первом этапе диссоциированные клетки гиппокампа мыши (E18) высаживались в первую и третью камеры. Средняя камера оставалась

пустой и культуры оставались не связанными, что соответствовало повреждению в нервной системе. На 2-й день культивирования начиналось прорастание аксонов из первой камеры в микроканалы и в среднюю камеру. Благодаря разработанной ассиметричной форме микроканалов, рост в обратном направлении из третьей камеры был незначительным. На втором этапе, на 11-й день развития культуры, в среднюю камеру были посажены диссоциированные клетки гиппокампа (E18). Аксоны из первой камеры полностью заполняли микроканалы и образовывали связи с нейронами средней камеры, в то же время аксоны средней камеры прорастали в микроканалы по направлению к последней камере и достигали ее на 18 день развития культуры (6-ой после посадки клеток).

Мы провели оценку заполнения микроканалов аксонами до и после посадки нейронов в среднюю камеру. Уже на следующий день после посадки клеток в среднюю камеру наблюдалось значительное увеличение заполненных аксонами микроканалов между второй и третьей, которое в дальнейшем увеличивалось и достигло 100% на 18 день развития (6 день после посадки). Процент заполненных каналов в направлении от первой камеры ко второй камере был высоким (76%) и до посадки, и достиг 100% на 1 день после посадки клеток в среднюю камеру.

Таким образом, слабые синаптические связи между двумя популяциями клеток нейронов гиппокампа могут быть усилены за счет интеграции новой популяции клеток на место роста аксонов. Новые клетки формируют дополнительные связи, строго направленные в одну сторону за счет микроканалов микрофлюидного чипа.

Научный руководитель – А. С. Пимашкин, канд. физ.-мат. наук.

УДК 612.83

Э. Р. Ахметзянова¹, Я. О. Мухамедшина¹, Л. Р. Галиева¹,
С. В. Огурцов^{1,2}, Е. В. Мартынова¹, И. А. Шульман^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань

²Республиканская клиническая больница МЗ РТ, Казань

elyaelya18@gmail.com

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СПИННОГО МОЗГА

Тысячи людей во всем мире страдают от травм спинного мозга (ТСМ). При этом подходы, используемые сегодня в клинике малоэффективны. Создание новых терапевтических подходов для лечения ТСМ, позволяющих восстановить функцию, является крайне необходимым и может помочь в значительном продвижении клинической медицины. При ТСМ в области повреждения наблюдаются воспалительные процессы и инфильтрация ткани различными иммунными клетками, которые проникают в ткань спинного мозга вследствие повреждения гематоэнцефалического барьера. В месте воспаления возникает иммунологическая дисфункция, причина которой до сих пор неясна. Кроме того, воспалительные процессы приводят к системной реакции и запускают иммунный ответ, потенциально способный вызвать аутоиммунные реакции после ТСМ. Становится очевидной необходимость исследования модуляции воспалительных и аутоиммунных реакций для разработки новых терапевтических препаратов при нейротравмах и тест-систем для оценки прогностического течения заболевания и влияния применяемой терапии.

Раннее нами на модели дозированной контузионной травмы спинного мозга крыс методом мультиплексного анализа проанализированы образцы сыворотки крови в острый и подострый

период ТСМ, выявлены сдвиги в продукции отдельных цитокинов/хемокинов. В результате исследования нам удалось определить потенциальные прогностические биомаркеры, определяющие риск развития осложнений, а также течения регенерации в период после ТСМ у животных. На сегодняшний день мы инициировали поиск и валидацию маркеров у человека, сопряженных с посттравматическими аутоиммунными и воспалительными процессами и собственно регенерацией. Для этого был создан банк крови и ликвора пациентов, полученных в остром, раннем, подостром и хроническом периодах ТСМ, содержащий более 100 образцов и еженедельно пополняющийся. В настоящий момент при помощи мультиплексного анализа нами проведены первые исследования данных образцов, проанализирована динамика изменения цитокинового профиля у отдельных пациентов и выявлена корреляция с клинико-инструментальными данными. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-1894.2017.7).

Научный руководитель – А.А. Ризванов, проф., чл.-корр. АН РТ, д-р биол.наук.

УДК 571.27

Е. В. Большакова, Е. В. Важдаева, Е. Н. Горшкова,
Е. А. Василенко, В. В. Мохонов
Университет Лобачевского, г. Нижний Новгород
lena16.07.95@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЛОКАТОРОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ

Введение. Селективная блокировка фактора некроза опухоли (TNF) на поверхности иммунных клеток миелоидного ряда является новым перспективным подходом к антицитокиновой терапии аутоиммунных заболеваний. Флуоресцентные биспецифические

белки, селективно блокирующие TNF, могут послужить основой для создания современных агентов для терапии.

Цель настоящей работы – получение биспецифических флуоресцентных наноантител BV1-Kat, BV1C-Kat, BV1mut-Kat и оценка их активности *in vitro*.

Материалы и методы. На основе генетических конструкций антител BV-1, состоящего из домена V_HH, связывающего TNF человека, и домена V_HH против поверхностного маркера F4/80 макрофагов, и контрольных антител BV-1C и BV1-mut, не способных связывать маркер F4/80, полученных ранее, были разработаны конструкторы, содержащие флуоресцентный белок Katushka. Ген Katushka был обработан эндонуклеазой рестрикции BspH I и клонирован в экспрессионные плазмиды, содержащие гены, кодирующие BV-1, BV-1C и BV1-mut по Xho I сайту рестрикции. С помощью ПЦР была отобрана корректная ориентация фрагментов. Штамм *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3)pLysS был трансформирован полученными плазмидами методом электропорации. Колонии *E. coli*, экспрессирующие целевые белки, были отобраны с помощью Вестерн Блота. Флуоресцентные белки были очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии с последующим трехэтапным диализом. Чистота белков в элюате была оценена методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Способность полученных наноантител блокировать TNF была оценена *in vitro* на клеточной линии WENI-164 в цитотоксическом тесте.

Результаты. Были получены экспрессионные штаммы для флуоресцентных биспецифических белков BV1-Kat, BV1C-Kat и BV1mut-Kat. Наноантитела BV1-Kat и BV1C-Kat экспрессировались в растворимой фракции и были очищены в нативных условиях в буферах, содержащих 25 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10% глицерина, 1 mM β-меркаптоэтанола, 0,02% TritonX-100. BV1mut-Kat экспрессировался в «тельцах включения», и его очистку проводили с использованием хаотропного агента (6 M гуанидин-HCl). Элюцию

всех белков проводили при концентрации имидазола 300 мМ. Для восстановления активной структуры BV1mut-Kat были подобраны условия рефолдинга белка (25 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 5 % сахарозы, 2 мМ EDTA, 5 мМ бутанола, 50 мМ аргинина и глутаминовой кислоты, 0,1 мМ и 1 мМ окисленной и восстановленной формы глутатиона, соответственно).

Концентрация белков, при которой наблюдалась 50% выживаемость клеток в цитотоксическом тесте после инкубации с летальной дозой TNF, составила: для BV1-Kat – $9,4 \cdot 10^4$ рМ, для BV1C-Kat – $2,9 \cdot 10^4$ рМ и для BV1mut-Kat – $5,4 \cdot 10^4$ рМ.

Заключение. В результате работы были сконструированы и получены биспецифические флуоресцентные наноантитела BV1-Kat, BV1C-Kat и BV1mut-Kat, блокирующие цитотоксическую активность TNF и готовые к последующим *in vitro* и *in vivo* исследованиям.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №17-04-01478) и в рамках государственного задания (шифр № 20.6156.2017/П220 и № 20.6445.2017/П220).

Научные руководители – В. В. Новиков, д-р биол. наук, проф.; И. В. Астраханцева, канд. биол. наук.

УДК 577.21

K.V. Havrysh¹, R.G. Kiyamova¹

¹ *Kazan Federal University*

kristinahavrysh@gmail.com

IDENTIFICATION OF POTENTIAL PREDICTIVE BIOMARKERS FOR OVARIAN CANCER TREATMENT

Ovarian cancer (OvCa) is the leading cause of cancer-associated death among gynecological diseases. Treatment resistance and late diagnosis are the major factors account for the high mortality associated with OvCa.

OvCa treatment resistance, as with most solid malignancies, can be intrinsic or acquired and has variety of mechanisms. Last decade studies showed that ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters play an important role in chemotherapy resistance. In tumor cells ABC transporters (P-gp/ABCB1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2) produce resistance by causing active efflux of antineoplastic drugs thus the intracellular concentration of drugs became below the effective cytotoxic threshold. However, successful predictive markers among ABC-transporters, as well as an effective and safety chemosensitizers, still are not used in clinical practice. Therefore, identification of OvCa chemoresistance markers among ABC-transporters is important to improve treatment and diagnostic strategies.

The aim of the present study was to evaluate the association of copy number alterations (CNA) of ABC efflux transporters of the “A” subfamily genes with resistance of OvCa cells to widely applied chemotherapeutic compounds.

The association of CNA (deletion - $\log_2 < -0,3$; gain - $\log_2 > 0,3$) of ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA7, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCA11P, ABCA12, ABCA13, ABCA17P genes in OvCa cell lines with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 6 chemotherapeutic drugs, namely Cisplatin, Docetaxel, Etoposide, Gemcitabine, Irinotecan, Vinorelbine, was analyzed using CNA data [CCLE_copynumber_byGene_2013-12-03.txt] and compound sensitivity data [v17a_public_raw_data] which were taken from public portals Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (<http://www.cancerrxgene.org>) and Cancer Cell Lines Encyclopedia (https://portals.broadinstitute.org/ccle_legacy/home) correspondingly. Statistical analysis was performed using RStudio software.

The association between CNA of ABCA1, ABCA2, ABCA7, ABCA11P, ABCA12 genes and drugs IC₅₀ using Wilcoxon-Mann-Whitney test was determined. Decreased copy number of ABCA1 (p-value=0.006), ABCA2 (p-value=0,006) and ABCA12 (p-value=0,005)

genes were significantly associated with better response of OvCa cell lines to Docetaxel. The same was true for OvCa cell lines with increased copy number of ABCA2 gene (p-value=0,009). The opposite was true for OvCa cell lines with deletions of ABCA7 gene (p-value=0,02). Better response to Irinotecan was observed for OvCa cell lines with deletions of ABCA1 gene (p-value=0,02). Moreover, OvCa cell lines with deletions of ABCA11P (p-value=0,03) and ABCA12 (p-value=0,04) were resistant to Cisplatin. Also, OvCa cell lines with gain of copy number of ABCA2 gene were more sensitive to Gemcitabine (p-value=0,03) and Vinorelbine (p-value=0,01).

Results suggest that CNA of ABCA1, ABCA2, ABCA7, ABCA11P, ABCA12 genes might be potential predictive biomarkers of OvCa chemotherapy and could be used for targeted-therapy in future. However, this study was preliminary and needs validation in vitro and in vivo.

Scientific adviser - R.G. Kiyamova, D. Sc., Assoc. Prof.

УДК 616-018

Л. Р. Галиева, Э. Р. Ахметзянова, Г. А. Масгутова,

В. Ю. Сыромятникова, Е. Ю. Закирова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

loisa_@mail.ru

ВЫЖИВАНИЕ И МИГРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТРАНСГЕННЫМ МЫШАМ С МОДЕЛЬЮ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Как известно, боковой амиотрофический склероз (БАС) является быстро прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, приводящим к смерти пациентов через 2-3 года после проявления первых симптомов. В последнее время исследователи возлагают большие надежды на лечение нейродегенеративных заболеваний,

основанное на использовании стволовых клеток, которые потенциально способны заменить погибшие клетки и синтезировать нейротрофические факторы и молекулы-стимуляторы нейрорегенерации. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут быть выделены из различных источников и обладать различным регенеративным потенциалом. В связи с этим цель данного исследования – провести сравнительную оценку выживания и миграционного потенциала МСК, полученных из жировой ткани (ЖМСК), костного мозга (КММСК) и пульпы зуба (ПМСК) при трансплантации трансгенным мышам с моделью бокового амиотрофического склероза (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J).

Животным 1-ой экспериментальной группы ретроорбитально вводили ЖМСК (1 млн клеток в 100 мкл 0,9% NaCl), животным 2-ой группы в том же количестве и в тех же условиях трансплантировали КММСК, животным 3-ей группы проводили трансплантацию ПМСК. Предварительно МСК из указанных источников были трансдуцированы LV-EGFP.

В ходе выполнения исследования была проведена оценка миграции и жизнеспособности трансплантируемых МСК через 7 и 14 сутки после введения. В спинном и головном мозге трансгенных мышей как на 7, так и на 14 сутки отмечено специфическое свечение EGFP. На 7 сутки после трансплантации это свечение было обнаружено в большей степени, однако достоверной разницы по количеству EGFP+-клеток между 7 и 14 сутками не наблюдалось. Обнаруженные клетки располагались преимущественно в сером веществе спинного и головного мозга, располагались единично, либо группами по 3-5 клеток. Интеграция трансплантируемых клеток в нервную ткань и преимущественно в серое вещество свидетельствует о возможном терапевтическом потенциале МСК при нейродегенеративных процессах, протекающих при БАС.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-07527.

Научный руководитель А.А. Ризванов, проф., д-р биол. наук.

УДК 612.82

М.М. Глявина^{1,2}, Т.О. Крапивницкая²,
А.О. Дягтерева¹, В.В. Дуденкова^{1,2}

¹ *Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава
России*

² *Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского
mariyannov@gmail.com*

ВЛИЯНИЕ CD131 РЕЦЕПТОРА НЕЙРОНОВ НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Одним из новых направлений в разработке методов нейропротекции при инсульте является использование в качестве терапевтической мишени общей рецепторной субъединицы димерного рецептора (β -cR) к эритропоэтину (EPOR). Проведенные ранее исследования выявили нейропротекторную роль активации данного рецептора после локальной ишемии. Целью данной работы было исследование влияния активации субъединицы эритропоэтинового рецептора β -cR на общую двигательную активность и когнитивные функции интактных мышей линии C57BL/6.

Для оценки общей двигательной активности и ориентировочно-исследовательской деятельности животных после введения внутривенно через 1, 3, 6, 12, 24 часа CdEPO проводили тестирование животных в установке «открытое поле» (Open Field LE800S, PanLab/Harvard Apparatus, Испания) до введения и через 4 и 10 дней после. Для оценки влияния CdEPO на когнитивные способности животного проводили тест «распознавание нового объекта» и тест «поиск входа в укрытие». Количество животных в каждой группе - 8. Для оценки распределения рецепторов к эритропоэтину (EPOR) в мозге проводили маркирование антителами к Anti-EPOR Receptor Rabbit polyclonal и флуоресцентным красителем AlexaFluor 555, ядра - красителем DAPI. Визуализация осуществлялась с помощью конфокального лазерного флуоресцентного

микроскопа LSM880 (Zeiss, Германия), иммерсионного объектива 40x и фильтра желто-зеленого спектра. Исследовались парафиновые корональные срезы мозга (стереотаксические координаты 1,7 мм от Bregma) толщиной 5 мкм. Обработка изображений проводилась в программе ImageJ.

Для количественного анализа поведения были выбраны: продолжительность реакции грумминга и реакции замирания, количество вертикальных стоек. Введение агониста β -cR увеличивает вертикальную двигательную активность на всех временных точках: выявлено достоверное увеличение количества вертикальных стоек, по сравнению с интактной группой ($p = 0,03$, критерий Вилкоксона) на 4-е сутки после введения, продолжительности реакции замирания на 10-е сутки после введения ($p = 0,04$, критерий Вилкоксона) и продолжительность реакции грумминга на 10-е сутки после введения ($p = 0,03$). Выявлено, что активация агонистом β -cR положительно влияет на обучение животных: на всех временных точках, время изучения нового объекта заметно увеличивалось по сравнению с группой, без введения препарата ($p = 0,02$, критерий Манна-Уитни). В первой серии теста «поиск входа в укрытие» лаз открыт. Далее задача усложняется: лаз присыпан опилками (вровень с полом) или закрыт пробкой (которую мышь должна сдвинуть или вытащить зубами). Мыши с активацией агонистом β -cR на всех точках быстрее решали новую задачу, по сравнению с контрольными животными ($p = 0,03$, критерий Манна-Уитни).

Анализ флуоресцентных изображений срезов мозга не выявил увеличения количества EPOR в исследуемой зоне на 10 сутки после введения препарата.

Проводимые исследования позволяют рассматривать β -cR субъединицу эритропоэтинового рецептора в мозге терапевтической мишенью, фармакологическая активация которых улучшает когнитивные функции мозга.

Научный руководитель: И.В. Мухина д-р биол. наук, проф.

А. Е. Гордеева

Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино.

gordeeva1310@yandex.ru

ПЕРОКСИРЕДОКСИН 6 – ПРОТЕКТОР КИШЕЧНОЙ И СОСУДИСТОЙ ТКАНИ ОТ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ

Ишемия - патологический процесс, который развивается при снижении уровня кровотока в органе на 50% от его нормальных значений, что приводит к развитию гипоксии. Однако самым опасным для жизнедеятельности клеток является не отсутствие кислорода, а его появление после длительной ишемии – реперфузия. Реперфузия приводит к повышению концентрации кислорода в ткани, что способствует генерации активных форм кислорода (АФК) и повреждению тканей. Тонкий кишечник является особенно уязвимым к ишемически-реперфузионному поражению (И-РП). Реперфузия ишемизированного кишечника сопровождается мощным окислительным стрессом, что приводит к повреждению на уровне микроциркуляторного русла и деструкции эпителия кишечника.

Было показано, что при реперфузии ишемизированного кишечника в первую очередь происходит поражение системы микроциркуляции в апикальной части ворсинок, что коррелирует с падением уровня перфузии кровью кишечной ткани и проходит параллельно с деструкцией слизистой оболочки. Реперфузионное поражение ишемизированных сосудов брыжейки характеризуется повреждением эндотелиальных клеток и утратой миогенного тонуса на фоне усиления экспрессии генов NO-синтаз и увеличения концентрации оксида азота в крови. В основе поражения и гибели клеток кишечной и сосудистой ткани при И-РП лежит общий механизм, который связан с увеличением апоптоза и снижением регенеративной способности ткани. Данные процессы проявляются

на фоне увеличения экспрессии генов ферментов-антиоксидантов P_{rx6}, GP_{x2}, GP_{x7}, SOD1 и SOD3 в эпителии кишечника и P_{rx6}, GP_{x1}, GP_{x3}, SOD2 и SOD3 в мезентеральных сосудах, что указывает на их ведущую роль в борьбе с гиперпродукцией АФК.

Одним из кандидатов на роль протектора кишечной ткани от И-РП является фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6 (P_{rx6}). Внутривенное введение P_{rx6} перед И-РП уменьшает поражение тонкого кишечника, что выражается в восстановлении уровня перфузии кровью кишечной ткани к концу реперфузионного периода на фоне снижения поражения слизистой оболочки во всем органе. Внутривенное введение P_{rx6} перед И-РП уменьшает поражение сосудов брыжейки, что выражается в сохранении миогенного тонуса и уменьшении поражения эндотелиальных клеток. Данные процессы отмечены на фоне усиления экспрессии генов NO-синтаз и изменения метаболизма оксида азота. Протекторный эффект P_{rx6} в сосудистой и кишечной ткани связан с его пероксидазной активностью, с процессами уменьшения апоптоза, увеличения регенеративной способности ткани и с нормализацией уровня экспрессии генов ферментов-антиоксидантов, что является критерием снижения гиперпродукции АФК при И-РП. Таким образом, P_{rx6} выступает агентом, который регулирует собственные антиоксидантные резервы для снижения поражения кишечной и сосудистой ткани при И-РП.

Работа выполнена при поддержке конкурса РФФИ (грант 17-44-500371 р_а) и конкурса «УМНИК» (договор №11430ГУ/2017).

Научный руководитель работы – В.И. Новоселов, проф. д-р биол. наук.

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ ТРАНСМИССИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГОЛОВНОЙ БОЛИ НАПРЯЖЕНИЯ

Актуальность. Головная боль напряжения (ГБН) является актуальной медицинской проблемой. Частота встречаемости ГБН колеблется от 30 до 70% в зависимости от особенностей региона, традиций и возрастного состава. Поскольку ГБН является стресс-индуцированным феноменом, постольку для лечения предлагаются препараты "центрального" действия: миорелаксанты и антидепрессанты. Учитывая ведущую патогенетическую роль стрессорных факторов в генезе ГБН, которые приводят к истощению стресс-лимитирующей ГАМК-ергической системы, перспективной выглядит роль ГАМК-ергических препаратов, не вызывающих зависимости и имеющих минимальный спектр побочных эффектов. Таким препаратом является аминафенилмасляная кислота (АФМК).

Цель исследования. Оценка эффективности АФМК при лечении ГБН у взрослых.

Контингент. Обследовано 117 пациентов с ГБН (83 женщины и 34 мужчины). У 87 пациентов (60 женщин и 27 мужчин) выявлена эпизодическая ГБН (ЭГБН), средний возраст пациентов $36,65 \pm 9,58$ лет, средняя длительность заболевания – $5,91 \pm 3,4$ года. У 30 пациентов (23 женщины и 7 мужчин) диагностирована хроническая ГБН (ХГБН), средний возраст пациентов $34,77 \pm 9,5$ лет, средняя длительность заболевания $7,06 \pm 4,95$ лет.

Методы. Интенсивность и длительность ГБ оценивали вычислением площади под кривой ГБ (ПКГБ), уровень тревоги и депрессии – по госпитальной шкале тревоги и депрессии, по анкете балльной оценки субъективных характеристик сна – качество сна, а для оценки чувствительности к стрессорам мы использовали оригинальный опросник.

После первого осмотра и оценки по шкалам всем пациентам рекомендовали прием АФМК в капсулах по 250 мг 3 раза в день. Через три недели повторяли оценку пациентов по вышеперечисленным шкалам. Затем предоставлялся перерыв в лечении на 7 дней для принятия решения о продолжении терапии еще в течение 3 недель, после чего проводилась третья оценка.

Результаты. При первичном осмотре у пациентов обеих подгрупп выявлены тревожные и депрессивные симптомы по HADS, причем симптомы тревоги преобладали при ЭГБН, а депрессии – при ХГБН. Качество сна было снижено, а стресс-сенситивность повышена в обеих подгруппах. При сравнении исходных показателей между подгруппами, установлены статистически значимые различия по показателям тревоги (выше при ЭГБН) и депрессии (выше при ХГБН).

Через три недели лечения АФМК в подгруппе ЭГБН и ХГБН произошли статистически значимые изменения показателей тревоги, депрессии, качества сна и стресс-сенситивности. Однако ПКГБ статистически значимо уменьшилась только в подгруппе ЭГБН.

После повторного трехнедельного приема препарата дальнейшие значимые изменения отмечены по всем показателям в подгруппе ЭГБН и ХГБН, кроме ПКГБ, которая при ХГБН не имела значимых отличий от предшествовавших показателей.

Заключение. ГБН, являясь стресс-индуцированным феноменом, возникает при снижении активности стресс-лимитирующих систем (в частности, ГАМК-ергической), что делает патогенетически обоснованным назначение ГАМК-ергических препаратов. АФМК оказывает положительное влияние на все стресс-индуцированные симптомы, сопутствующие ГБН и может быть рекомендована как универсальный стресс-протектор и нейропротектор.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

УДК 57.089.6: 57.085.1: 617-089.844

А.И. Звягина^{1,2}, И.С. Фадеева², В.В. Минайчев^{1,2},

П.О. Кирсанова², В.С. Акатов².

¹*Пушкинский государственный естественно-научный институт*

²*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,*

г.Пушкино

alennazvyagina@gmail.com

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛЯРНЫХ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ ОГРАНИЧИТЕЛЬНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Разработка и создание биологических резорбируемых ограничительных мембран (ОгМ) направленного действия по-прежнему является актуальной задачей.

Целью работы стало исследование особенностей межтканых взаимодействий и биоинтеграции ОгМ на основе децеллюляризованного ксеноперикарда (ДП).

В эксперименте использовались ОгМ на основе ДП половозрелых быков. Ткани прошли стадию децеллюляризации смесью детергентов на основе DCN + SDS. Для оценки барьерной функции, степени биоинтеграции и специфики минерализации ДП использовалась модель гетеротопической имплантации крысам (самцы линии Wistar, вес 180-200 г) тестируемых образцов в титановых камерах на срок 30, 45 и 70 сут. После выведения животных из эксперимента проводили морфологическую оценку образцов с помощью гистологического (окраска Н&Е) и ИГХ (CD68⁺, антитела к α -гладкомышечному актину) анализов. Количественное определение минерализованного кальция в образцах до и после имплантации выполняли с помощью адсорбционной спектроскопии ($n \geq 6$, критерий Уитни-Манна).

Было выявлено, что полученные ОгМ на основе ДП являются биосовместимыми и обладают выраженным полярным эффектом. ИГХ-анализ показал слабо выраженную гистиоцитарную реакцию на материал, а также активную миграцию миофибробластов преимущественно со стороны фиброзного слоя перикардального материала (*p.fibrosum*). После 4 нед. имплантации со стороны серозного слоя (*p.serosum*) образцов было обнаружено активное формирование грануляционной васкуляризованной ткани, которая полностью редуцировалась к 10 нед. При этом васкуляризация собственно мембраны наблюдалась только после 10 нед. имплантации. Со стороны *p.fibrosum* наблюдалось формирование рыхлой фиброзной капсулы поверх четко выраженной границы начальной минерализации. Локальная кальцификация контактного слоя со стороны фиброзы значительно усиливалась к 6 нед., и на сроке 10 нед. наблюдались участки резорбции кальцифицированных компонентов матрикса. Количественный анализ кальция показал нарастание степени минерализации образцов, и к 10 нед. имплантации содержание кальция в образцах достигало 94 ± 20 мкг/мг сухого веса ткани (в 9 раз превосходит результаты, полученные после 4 нед.). При этом отложение минерализованного кальция наблюдалось преимущественно со стороны *p.fibrosum* и полностью отсутствовало со стороны серозного слоя.

В ходе данного исследования была показана высокая биосовместимость и активная биоинтеграция ОгМ на основе ДП, а также успешное выполнение материалом барьерной функции на срок до 10 недель. Четко выраженная локализация процессов регенерации (минерализация со стороны *p.serosum*, формирование обильно васкуляризованной грануляционной ткани на *p.fibrosum*) на полярных поверхностях Огм на основе ДП, говорит о перспективности мембран на основе перикарда для достижения GBR-эффекта (направленной и контролируемой регенерации костной ткани).

Научный руководитель – В.С. Акатов, д-р физ.-мат. наук, проф.

УДК 57.089.6: 57.085.1: 617-089.844

А. С. Сенотов^{1,2}, П. О. Кирсанова^{1,2}, В. В. Минайчев^{1,3},
М. И. Кобякова^{1,3}, И. С. Фадеева^{1,2,3}

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.
Пушино;*

² *ООО НПК «Рецептор», г. Пушино;*

³ *Пушинский государственный естественно-научный институт
a.s.senotov@gmail.com*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОКОЛОВ ОЧИСТКИ ДОНОРСКОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ, ПРИМЕНЯЕМОЙ ДЛЯ НУЖД РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ

Современные клинические способы устранения long-size костных дефектов по-прежнему представляют актуальную проблему в ортопедической хирургии, что обусловлено недостатком данных о механизмах ремоделирования остеопластических материалов.

Приобретение и/или сохранение биоматериалом таких свойств, как биосовместимость, остеокондуктивность и стимуляция репаративных процессов, достигается за счет тщательной децеллюляризации, делипидизации и деминерализации, основным условием которых является максимальное сохранение нативной структуры внеклеточного костного матрикса донорской костной ткани (ДКТ). Существующие методы и технологии очистки несовершенны, а подавляющая часть материалов мирового рынка не соответствует заявленным свойствам в требуемом объеме. В лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН активно ведется разработка технологий предимплантационной обработки ксеногенного донорского материала (КРС, губчатая кость; композиты компактной и губчатой кости). По результатам проведенных ранее исследований установлена прямая зависимость между глубиной очистки ДКТ и инициацией асептического кальциноза материалов,

приводящей к преждевременной резорбции в организме реципиента. В то же время обнаружено, что сверхглубокая очистка матрикса предотвращает нарастание фронта физиологической минерализации имплантируемых материалов на основе ДКТ.

Таким образом, целью данной работы является комплексное исследование различных протоколов очистки донорской костной ткани, включая использование деминерализованных (ДКМ) и частично деминерализованных (чДКМ) образцов ДКТ в модели гетеротопической имплантации крысам.

Обработку ДКТ проводили при помощи энзимов, слабых орг. кислот, полярных растворителей, мягких хелатирующих и делипидизирующих агентов (ноу-хау). Регенеративный потенциал образцов исследовали на самцах крыс линии Wistar (сроки имплантации 21 и 50 суток). Использовались следующие стандартные и дифференциальные гистологические окраски: Н&Е, по Ван-Гизону, трихром Массона-Голднера, по Мак-Ги-Расселу и др., а также флуоресцентная и конфокальная микроскопия; Leica TCS SP5 (Германия); Nikon Eclipse Ti-E (Япония). С целью получения объективных данных, указывающих на истинную реакцию реципиента на материал, производилось получение гистотопограмм криосрезов с использованием ПО NIS Elements. Количественное определение минерализованного кальция в образцах до и после имплантации выполняли при помощи адсорбционной спектроскопии с использованием Tekan Infinite F-200 (Австрия) ($n \geq 6$).

В докладе подробно обсуждаются основные использованные подходы и полученные результаты, которые указывают на перспективы применения ДКМ и чДКМ с использованием щадящей обработки донорской костной ткани.

Полученные данные позволили перейти к гос. регистрации разработанных остеопластических материалов на основе ДКМ и чДКМ, а также к их внедрению в клиническую практику.

Научный руководитель – д-р физ.-мат. наук, проф., В.С. Акатов

Д.М. Кузьмина¹, И.И. Белоусова²

*¹Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского*

*²Нижегородская государственная медицинская академия
Минздрава России
dariak2294@gmail.com*

ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ФЕНОТИПА И ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ БЛОКАДЫ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

Целью исследования является изучение отдаленных последствий длительной блокады NMDA-рецепторов мозга на комплекс поведенческих реакций мышей, отражающих фенотип поведения при моделировании шизофрении в эксперименте.

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6 (самцы), возраст 8 недель, n = 25; использовался неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов – (-/-) МК-801. Блокада рецепторов осуществлялась в течение 10 дней. В контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Использовались следующие поведенческие методики: исследование изменения предстимульного торможения, социального поведения (тест Кроули), объектного распознавания. Затем было проведено иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов мозга животных.

В результате группы поведенческих экспериментов были выявлены нарушения фенотипических показателей мышей в результате длительного введения МК-801. При исследовании было выявлено, что на четвертый день блокады рецепторов наблюдаются нарушения реакции предстимульного торможения. К десятому дню введения МК-801 реакция предстимульного торможения нарушается лишь с использованием определенного

уровня громкости престаимула. Отклонений социальной активности животных выявлено не было: животные экспериментальной группы, так же, как и животные контрольной группы, достоверно меньше времени проводили в пустом отсеке по сравнению с отсеком с животным. В то же время, животные после курсового введения МК-801 выявили нарушения в предпочтении социальной новизны: они равное количество времени находились как в отсеке с незнакомым животным, так и в отсеке с уже знакомым животным. При исследовании объектного распознавания животные группы МК-801 проявляли стремление к изучению уже знакомого объекта, достоверно меньше времени изучая незнакомый объект, что говорит о нарушении рабочей памяти у животных в результате долговременного введения МК-801.

Исследование парафиновых срезов мозга с использованием иммуноцитохимического окрашивания показало, что структура внеклеточного матрикса в виде перинейрональных сетей клеток, расположенных в области коры и ядер миндалина, нарушена.

Исходя из результатов, сделаны выводы:

1. Предстимульное торможение у мышей линии C57BL/6 в результате длительного введения МК-801 снижается, при этом наиболее выраженное снижение достигается при использовании престаимула громкостью 76 Дб;

2. Социальная активность мышей линии C57BL/6 в результате длительного введения введения МК-801 сохраняется, тогда как направленность на получение нового социального опыта снижается;

3. Способность к распознаванию неживых объектов на 10 день курсового введения МК-801 ослабевает;

4. Длительное введение антагониста NMDA-рецепторов МК-801 вызывает изменение локализации перинейрональных сетей внеклеточного матрикса мозга.

Научный руководитель – И.В. Мухина, проф., д-р биол. наук.

Д. В. Луговец ¹, В. А. Поздина ²

¹ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, г. Екатеринбург

² Институт иммунологии и физиологии (УРО РАН),
г. Екатеринбург

¹ ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург

dyana.lougovets@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ИНТАКТНЫХ И СТИМУЛИРОВАННЫХ АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНОМ НАТРИЯ МАКРОФАГОВ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ *IN VITRO*

Макрофаги – это разнородная группа клеток, отличающихся морфологически и функционально, и представленная во всех тканях организма. Благодаря высокой гетерогенности, данный тип клеток играет важную роль в патогенезе различных заболеваний. В настоящее время большой интерес представляет возможность модулированного воздействия на макрофаги, которая является одним из альтернативных методов лечения болезней. Поэтому существует необходимость подробно изучить особенности функционирования различных популяций макрофагов и их реакции на всевозможные стимулы, в том числе на иммуномодулирующие препараты.

В данной работе были определены следующие морфологические показатели: площадь клетки, площадь ядер, ЯЦО (ядерно-цитоплазматическое отношение) интактных и стимулированных аминоксидигидрофталазиндионом натрия (далее АДФН) в концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл макрофагов различной локализации (перитонеальная область, лёгкие, печень, селезёнка) самцов линии Wistar ($m_{cp} = 230г$) в условиях культивирования на 1-е и 3-и сутки.

Были показаны морфологические особенности интактных и промодулированных макрофагов различной тканевой локализации. При модуляции АДФН в концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл было установлено, что морфология клеток заметно изменялась. Во-первых, в исследуемые сроки в популяции перитонеальных макрофагов появляется большое количество отростчатых «дендритоподобных» клеток по сравнению с интактной группой: контроль 1-е сутки - 612 клеток, 3-и сутки – 93 клетки; АДФН 5 мкг/мл 1-е сутки – 2691 клеток, 3-и сутки – 160 клеток; АДФН 10 мкг/мл 1-е сутки – 3962 клеток, 3-и сутки – 1206 клеток соответственно. Полученные данные подтверждают имеющуюся в литературе гипотезу, что перитонеальные макрофаги легко дифференцируются в дендритные клетки (ДК).

Во-вторых, при внесении АДФН у альвеолярных и печеночных макрофагов на первые сутки наблюдается статистически значимое увеличение ядерно-цитоплазматического отношения по сравнению с контрольной группой, сопровождающееся уменьшением площади ядер у печеночных макрофагов.

Что касается перитонеальных и селезеночных макрофагов, то в их популяциях на первые сутки после воздействия препарата ядерно-цитоплазматическое отношение снижается на фоне уменьшения площади клеток и ядер у перитонеальных макрофагов и увеличения этих параметров у селезеночных макрофагов. На третьи сутки после воздействия препарата изменения всех указанных морфологических показателей по сравнению с контрольной группой носят строго обратный характер.

Таким образом, исследование показало, что влияние аминодигидрофталазиндиона натрия на морфологические характеристики макрофагов зависит от дозы, продолжительности его воздействия на клетки, и от принадлежности макрофагов тому или иному органу.

Научный руководитель – И.Г. Данилова, д.б.н., профессор;
М.В. Улитко, к.б.н., доцент.

УДК 577.29

А. А. Макарцова¹, А. А. Немудрая¹, Н. В. Губанова²,
В. А. Рихтер¹, Е. В. Кулигина¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, г. Новосибирск*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск*
makartsova.05@gmail.com

ПОЛУЧЕНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ГЛИОБЛАСТОМЕ ЧЕЛОВЕКА, ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Разработка средств адресной терапии онкологических заболеваний получила широкое развитие в области биомедицинских исследований. Адресность воздействия на опухоль может быть обеспечена короткими пептидами – опухоль-адресующими пептидами – обладающими способностью избирательно накапливаться в опухолевой ткани. Такие пептиды могут быть получены путем скрининга фаговых пептидных библиотек (ФПБ) на раковых клетках *in vitro* и/или опухолевых моделях *in vivo*.

Глиобластома является наиболее агрессивной и распространённой опухолью головного мозга, которая диагностируется в 70% случаев развития злокачественных глиом. Несмотря на комплексный подход при лечении глиобластом в подавляющем большинстве случаев терапевтическое воздействие имеет паллиативный характер, при этом средняя продолжительность жизни пациентов после начала лечения составляет 14 месяцев.

Целью данной работы является получение опухоль-адресующих пептидов, специфичных к опухолям головного мозга – глиобластомам.

В качестве объекта для скрининга ФПБ была выбрана мультиформная глиобластома человека U87-MG. Был проведен

комплексный скрининг ФПБ в системах *in vitro* и *in vivo*, по результатам которого были выбраны пептиды-кандидаты для дальнейшего исследования их опухоль-специфичности.

Научный руководитель – Е. В. Кулигина, канд. биол. наук.

УДК 517.5.

Масгутова Г.А., Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И.,

Сыромятникова В.Ю., Муллахметова А.Ф., Ризванов А.А.

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

²*Республиканская клиническая больница МЗ РТ, Казань*

galina2526@gmail.com

СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО ПРЕФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Разработка методов стимуляции регенерации поврежденных периферических нервов направленных на восстановление целостности нерва и васкуляризации представляется актуальной в связи с длительным восстановительным периодом и высокой частотой посттравматических осложнений, таких как потеря двигательной и чувствительной функции, что существенно снижает качество жизни пациента.

В работе исследован результат прямой генной терапии с факторами роста VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста и FGF2 - фактор роста фибробластов-2 при травматическом повреждении седалищного нерва у крыс методами одномоментного рассечения/сшивания и аутонервной вставки протяженностью 5 мм.

Было показано, что прямая генная терапия с плазмидными векторами доставки терапевтических генов VEGF и FGF2 стимулирует васкуляризацию нерва, что было зафиксировано на лазерном доплере (Easy LDI, Aimago) и подтверждено при гистологическом исследовании дистальных фрагментов поперечных

срезов седалищного нерва, поддерживает выживание чувствительных нейронов спинального ганглия L5, оказывает нейропротекторное действие в отношении субпопуляции нейронов малого диаметра (болевые нейроны) и стимулирует восстановление двигательной функции оперированной конечности.

Полученные нами результаты подтверждают существенную роль плазмидных векторов доставки терапевтических генов в процессе посттравматической регенерации периферических нервов.

УДК 57.089.6: 57.085.1: 617-089.844

**В.В. Минайчев^{1,2}, А. С. Сенотов², К.А. Меньших^{2,3},
А.И. Звягина^{1,2}, И.С. Фадеева^{1,2}, В. С. Акатов^{1,2}**

¹ *Пушинский государственный естественно-научный институт*

² *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*

³ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

vminaychev@gmail.com

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА IN VIVO НАНОПАСТ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

В современной реконструктивной хирургии костной ткани (РХКТ) используются различные остеопластические материалы на основе кальцийфосфатных соединений (КФС). Одним из наиболее используемых КФС в РХКТ является гидроксиапатит (ГАп).

Объектом исследования в данной работе являлась нанопаста (НП) на основе ГАп, запланированная к использованию как материал для малоинвазивных хирургических вмешательств. Исследуемый ГАп (со средним $\bar{\varnothing}$ частиц 20 нм) синтезировался в ИБХФ РАН (д.х.н. Телешев А. Т. и соавт.) в условиях механо-акустической обработки водной реакционной смеси $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ с

помощью роторно-пульсационного аппарата и термической очистки, с последующим приданием пастообразной формы в водной среде.

Ранее было показано, что данная НП не обладает цитотоксичностью *in vitro*, однако препятствует адгезии и пролиферации клеток на своей поверхности, что говорит об её слабой остеокондуктивности.

В связи с этим была проведена гетеротопическая имплантация образцов НП с кондуктивным и индуктивным компонентами с целью изучить их биосовместимость в условиях *in vivo*. В качестве кондуктивного компонента использовалась костная крошка (КК), в качестве индуктора – обогащенная тромбоцитами плазма (ОбТП).

В эксперименте участвовало 4 группы: нанопаста (НП); НП (75 об. %) + КК (25 об. %); НП (75 об. %) + ОбТП (25 об. %); НП (50 об. %) + КК (25 об. %) + ОбТП (25 об. %).

Образцы в объеме 0.5 мл помещались в титановые камеры (диаметр пор 50 мкм) и имплантировались субкутанно крысам.

На сроках имплантации 3 и 6 недель не наблюдались неоколлагенез и резорбция ГАп во всех группах, кроме НП + КК + ОбТП, где наблюдалось образование фиброзной капсулы.

На сроках 13 недель имплантации в образцах НП наблюдалась полная остановка миграции и пролиферации клеток.

В образцах НП + ОбТП не наблюдался неоколлагенез и резорбция ГАп. В образцах НП + КК + ОбТП происходила резорбция ГАп с образованием фиброзной капсулы вокруг материала.

В образцах НП + КК наблюдалась более медленная резорбция ГАп (по сравнению с НП + КК + ОбТП), при этом наблюдалось образование трабекуло-подобных структур с встраиванием ГАп в данный новообразованный матрикс.

Увеличенная скорость резорбции образцов НП + КК + ОбТП может быть связана с аддитивным эффектом КК и ОбТП или(и) с уменьшением содержания ГАп в образцах.

Полученные данные говорят о необходимости дополнительного использования остеокондуктора для заселения НП клетками, а также ставят вопрос о необходимости изучения дозозависимого эффекта ГАп и выявления его оптимальной дозы в остеопластических материалах.

Также остаются открытыми вопросы насыщения НП различными остеоиндукторами и индукторами неоваскуляризации, обеспечивающими физиологическую аугментацию КТ в области дефекта, что является дальнейшими этапами в цикле работ.

УДК: 577.29

Л.Ф. Минигулова¹, Д.В. Савенкова¹, К. В. Гавриш¹,
В.С. Скрипова¹, И.Г. Серебрянский², Р.Г. Киямова¹

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Центр исследований рака “Fox Chase”, Филадельфия, США*

minigulovalf@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ К ЦИСПЛАТИНУ

Цисплатин – цитотоксический препарат, его действие основано на образовании внутри- и межмолекулярных сшивок в ДНК, что приводит к нарушению процессов репликации и транскрипции, и, как следствие, к задержке клеточного цикла и апоптозу.

Несмотря на широкое использование цисплатина в химиотерапии, в настоящее время существует проблема возникновения устойчивости опухолевых клеток к препаратам платины. Причинами этого могут служить нарушения накопления цисплатина в клетке, или развитие механизмов репарации аддуктов ДНК в опухоли. Поэтому поиск новых генов-мишеней, продукты которых могут участвовать в регуляции

чувствительности к действию цисплатина, является актуальной задачей для терапии онкологических заболеваний.

Для поиска таких генов-мишеней используют разнообразные подходы, включая биоинформатический анализ, технологию CRISPR/Cas9, нокдаун генов с помощью siRNA и другие методы. Ранее, в нашей лаборатории с помощью биоинформатического анализа было показано, что снижение экспрессии гена 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (PGD) способствует увеличению чувствительности опухолевых клеток к цисплатину (Garopova et al., 2017). В связи с этим был выбран подход по ингибированию активности продукта гена PGD, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, с помощью селективного ингибитора Phycion (R.Lin et al., 2015).

Целью работы было изучение влияния ингибирования 6PGD с помощью селективного ингибитора Phycion на чувствительность опухолевых клеточных линий к цисплатину.

Для этого клетки линий плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC61 и рака поджелудочной железы AsPC-1 инкубировали с цисплатином в диапазоне концентраций от 1 до 128 мкМ в условиях «с» и «без» добавления ингибитора Phycion (10 и 25 мкМ). Согласно полученным данным были построены кривые жизнеспособности в программе GraphPad Prism и определены значения IC50. Уровень статистической значимости между IC50 определяли с помощью критерию Фишера. Статистически значимыми признавались значения $p < 0,05$.

В результате проведенных исследований было показано, что добавление Phycion (10 и 25 мкМ) повышает чувствительность клеточной линии SCC61 на 18 и 13 процентов, соответственно. Ингибитор Phycion (10 мкМ) повышает чувствительность опухолевой клеточной линии AsPC-1 на 30%.

Таким образом, ингибирование 6PGD увеличивает чувствительность опухолевых клеточных линий SCC61 и AsPC-1 к цисплатину. Дальнейшее изучение механизма наблюдаемого эффекта может быть полезно при разработке новых сенситизирующих противоопухолевых препаратов.

Научный руководитель – Р.Г. Киямова, д-р биол. наук, доцент.

Я. О. Мухамедшина¹, А. А. Костенников¹, И. А. Шульман^{1,2},

С. В. Огурцов^{1,2}, Е. Ю. Закирова¹

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

²*Республиканская клиническая больница МЗ РТ*

yana.k-z-n@mail.ru

ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ТРАВМИРОВАННОГО СПИННОГО МОЗГА СВИНЬИ АПЛИКАЦИИ НА ОБЛАСТЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЗАКЛЮЧЕННЫХ В ФИБРИНОВЫЙ МАТРИКС

Травматическое повреждение спинного мозга (ТСМ) приводит к нарушению чувствительной и двигательной функции, неизбежно ведущих к глубокой инвалидизации. Средний возраст пациентов с данной патологией составляет 31 год, что связано с высоким уровнем травматизма. Распространенность ТСМ неуклонно растет, и к 2020 году по прогнозам составит более 30 млн. людей во всем мире. При этом заболевание на сегодняшний день остается неизлечимым. Возможность преодоления последствий ТСМ связывают с применением клеточной терапии. Достаточно перспективными представляются мезенхимные стволовые клетки (МСК), которые обладают позитивными свойствами, позволяющими этим клеткам способствовать регенерации аксонов: (1) возможностью секреции различных нейротрофических факторов и цитокинов, (2) возможностью дифференцировки в различных направлениях, (3) иммуномодулирующим, (4) противоапоптозным и (5) противовоспалительным эффектами.

В данной работе мы исследовали эффективность наложения на область повреждения спинного мозга свиньи (подострый период) аутологичных МСК, заключенных в фибриновый матрикс Tissucol. Эксперименты были проведены на вьетнамских вислобрюхих свиньях,

половозрелых самках весом 9–12 кг. Животным под наркозом на уровне Th11 спинного мозга после ламинэктомии наносили ТСМ вертикально падающим металлическим стержнем весом 50 г с высоты 20 см с последующей компрессией тем же грузом в течение 10 минут. Через 6 недель после нанесения травмы на область повреждения накладывали МСК (8 млн) из жировой ткани, заключенные в фибриновый матрикс Tissucol (Baxter, 150 мкл). Животным контрольной группы в аналогичных условиях эксперимента накладывали Tissucol без клеток. Результаты исследования свидетельствуют, что применение МСК способно стимулировать посттравматическую регенерацию спинного мозга свиньи, что проявляется в виде улучшения восстановления двигательной функции, а также увеличения сохранности ткани и снижения посттравматической кавитации. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-34-60101.

Научный руководитель – А.А. Ризванов, проф., чл.-корр. АН РТ, д-р биол.наук.

УДК 576.54:576.33

Я.И. Пигарева¹, А.А. Гладков^{1,2}, Д.В. Кутьина¹,
И.В. Мухина², А.С. Пимашкин¹

¹ *Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского*

² *Нижегородская государственная медицинская академия
pigareva@neuro.nnov.ru*

КОННЕКТОР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР, ВЫРАЩЕННЫХ НА МИКРОЭЛЕКТРОДНЫХ МАТРИЦАХ

На сегодняшний день одним из удобных объектов для изучения процессов памяти, обучения и передачи информации в мозге являются нейрональные культуры *in vitro*. Спонтанная

биоэлектрическая активность, возникающая в нейронных сетях *in vitro*, имеет отличия от нормальной физиологической активности в живом мозге. Одна из возможных причин данного явления связана с отсутствием внешнего афферентного сигнала. Несмотря на то, что нейрональные культуры используются для исследования различных фундаментальных задач, в том числе связанных с развитием структуры нейронной сети и обучением, практически все эксперименты с ними проводятся без постоянной внешней стимуляции, которая бы симулировала сенсорные сигналы. В данной работе представлено устройство, позволяющее проводить долговременную непрерывную стимуляцию нейрональных культур. Мы предполагаем, что активность культур, выращенных в условиях такой стимуляции, будет подобна активности нейронных сетей *in vivo*.

В разработанном устройстве сигнал от стимулятора передавался через контактную плату на контактные площадки микроэлектродной матрицы (МЭМ) и далее на нейрональную культуру.

Основными составляющими коннектора являются пластиковый корпус и плата с токопроводящими дорожками, подводящая стимулы к МЭМ. Модель корпуса была выполнена в программе Tinkercad и реализована на 3D-принтере Ultimaker 2 plus (Ultimaker B.V., Нидерланды) из PLA пластика. Контактная плата выполнена из текстолита, и содержит 4 золотых пружинных электрода (Preci-Dip, Швейцария), которые соединены токопроводящими дорожками с разъемом для подключения к стимулятору.

Представленный коннектор был создан в инженерной лаборатории, оснащенной 3D принтером, в течении нескольких дней. Простота в изготовлении позволяет создать множество устройств и использовать с одним стимулятором, что позволит проводить множество длительных экспериментов одновременно. Наличие в основании корпуса отверстия, закрытого покровным стеклом, позволяет проводить наблюдения на инвертированном микроскопе без нарушения условий стерильности

внутри корпуса устройства. На крышке располагается цилиндрический выступ для установки фильтрующей пленки, которая пропускает CO₂, необходимый для жизнедеятельности клеток. На время эксперимента коннектор находится в инкубаторе, где нейрональная культура находится в оптимальных для развития условиях. Сохранение жизнеспособности нейронов при развитии нейрональной культуры в условиях хронической стимуляции было подтверждено культивированием дифференцированных нейронов гиппокампа эмбрионов мышей (E18) на протяжении 17 дней.

Таким образом, разработанный коннектор может использоваться для проведения исследований нейрональных культур *in vitro* в условиях хронической стимуляции, симулирующей афферентацию.

Научный руководитель – И.В. Мухина, д-р биол. наук, проф.

УДК 615.038

Т. Н. Позмогова^{1,2}, А. О. Соловьева²,
А. А. Иванов^{1,2,3}, М. А. Шестопапов^{2,3}

¹ *Новосибирский государственный университет*

² *Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, филиал Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск*

³ *Институт неорганической химии имени А. В. Николаева СО РАН, г. Новосибирск*

tnp_post@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ И ИХ КОНЪЮГАТОВ С ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ В СИСТЕМАХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Благодаря своим рентгеноконтрастным и люминесцентным свойствам кластерные комплексы рения и вольфрама являются перспективными агентами в таких областях как лучевая диагностика,

ортопедия и травматология, фундаментальные биологические исследования. Для понимания возможностей внедрения этих соединений в клиническую практику необходимо всесторонне изучить их влияние на живые клетки и организм животного в целом.

В предварительных исследованиях нашей научной группой было показано, что октаэдрические кластерные комплексы с химической формулой $\text{Na}_4[\{\text{Re}_6\text{Te}_8\}(\text{CN})_6]$ демонстрируют низкую токсичность и высокую рентгеноконтрастность. Следующим этапом стало повышение биосовместимости данного комплекса. Для этой цели теллуридный кластерный комплекс был сконъюгирован с молекулами циклодекстринов.

Для оценки влияния молекул циклодекстрина на токсичность кластерных комплексов было проведено сравнение действия на клетки и на организм чистого октаэдрического теллуридного кластерного комплекса рения ($\text{Na}_4[\{\text{Re}_6\text{Te}_8\}(\text{CN})_6]$) и конъюгата данного комплекса с молекулами циклодекстрина ($\text{Na}_4[\{\text{Re}_6\text{Te}_8\}(\text{CN})_6\text{@CD}$).

На культурах клеток была оценена цитотоксичность растворов исследуемых комплексов с помощью МТТ-теста и двойного окрашивания красителями Hoechst и Propidium iodide. В результате было показано, что конъюгация с циклодекстрином понижает цитотоксичность данных комплексов.

В системе *in vivo* было проведено сравнение острой токсичности исследуемых веществ на линии мышей СВА. Для группы с чистым кластерным комплексом полулетальная доза составила 502 мг(Re)/кг, тогда как для комплекса $\text{Na}_4[\{\text{Re}_6\text{Te}_8\}(\text{CN})_6\text{@CD}$ LD50 превысила 1000 мг(Re)/кг. Для оценки влияния кластерных комплексов на органы животных и выявления органов-мишеней был проведен морфологический анализ печени, почек, селезенки, сердца и легких животных через 2 недели после введения растворов.

Итак, конъюгация октаэдрического кластерного комплекса рения $\text{Na}_4[\{\text{Re}_6\text{Te}_8\}(\text{CN})_6]$ с молекулами циклодекстринов повышает

биосовместимость данного соединения, позволяя вводить его в организм внутривенно в высокой дозировке. Это позволяет предположить, что полученное соединение $\text{Na}_4[\{\text{Re}_6\text{Te}_8\}(\text{CN})_6]@\text{CD}$ может стать перспективным агентом для разработки на его основе безопасных для организма рентгеноконтрастных веществ для функциональной диагностики.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00542

Научные руководители – д-р биол. наук, проф. Л. В. Шестопалова, д-р мед. наук А. Ф. Повещенко.

УДК: 577.29

Д.В. Савенкова¹, Л.Ф. Минигулова¹, К.В. Гавриш¹,
В.С. Скрипова¹, И.Г. Серебрянский², Р.Г. Киямова¹

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Центр исследований рака “Fox Chase”, Филадельфия, США*

darina.saval@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ SMARCA 2/4 НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ SCC61 К ЦИСПЛАТИНУ

Препараты платины – цитостатические противоопухолевые химиотерапевтические препараты алкилирующего типа, содержащие в составе молекул двухвалентную платину (II). Механизм действия цисплатина основан на нарушении функций ДНК, вызванном химическим повреждением её оснований. Повреждения ДНК возникают путём образования координационных связей между атомом платины и двумя основаниями ДНК, в результате чего в ДНК образуются внутри- и межнитевые сшивки. На клеточном уровне цисплатин вызывает нарушение репликации и транскрипции, что ведёт к задержке клеточного цикла и апоптозу.

Установлено, что у ряда злокачественных опухолей может

развиваться резистентность к цисплатину в связи с нарушениями его накопления в клетке, или нарушением механизмов репарации ДНК в опухоли. Поэтому актуальной задачей является увеличение чувствительности опухолевых клеток к действию цисплатины путём поиска новых генов-мишеней, продукты которых могут участвовать в регуляции чувствительности к препарату.

Известно, что снижение экспрессии генов АТФ-зависимых хеликаз *SMARCA2* и *SMARCA4* может влиять на чувствительность опухолевых клеток к цисплатину [*Fedorov et al., 2015*]. В связи с этим был выбран селективный ингибитор продуктов генов *SMARCA2*, *SMARCA4* – PFI-3 [*Vangamudi et al., 2015*].

Целью работы было изучение влияния ингибирования *SMARCA2/4* с помощью PFI-3 на чувствительность опухолевой клеточной линии плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC61 к цисплатину.

Для изучения влияния ингибирования продуктов генов *SMARCA 2* и *SMARCA 4* клетки линии SCC61 инкубировали с цисплатином в диапазоне концентраций от 1 до 128 мкМ с добавлением ингибитора Phycion (25 и 50 мкМ). Согласно полученным данным были построены кривые жизнеспособности в программе GraphPad Prism и определены значения IC50. Уровень статистической значимости между значениями IC50 в экспериментах с добавлением ингибитора и без, определяли согласно критерию Фишера. Статистически значимыми признавались значения $p < 0,05$. В результате было показано, что PFI-3 в количестве 25 и 50 мкМ понижал чувствительность клеточной линии SCC61 к цисплатину на 28 и 65 процентов, соответственно.

Таким образом, при ингибировании белков *SMARCA2* и *SMARCA4* с помощью PFI-3 наблюдается уменьшение чувствительности клеточной линии SCC61 к цисплатину. Дальнейшее исследование наблюдаемого эффекта важно для изучения механизмов резистентности опухолей к терапии цисплатином.

Научный руководитель – Р.Г. Киямова, д-р биол. наук, доцент.

А. А. Серяпина^{1,2}

¹*Новосибирский государственный университет*

²*Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск*

seryapina@bionet.nsc.ru

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА КРЫСАХ ЛИНИИ НИСАГ

Гипертоническая болезнь (ГБ) является одной из самых частых причин смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы. Несмотря на достаточную изученность механизмов поддержания высокого артериального давления (АД) и многообразие препаратов для снижения уровня АД и лечения осложнений, возникающих при устойчивой ГБ, в настоящее время сохраняет актуальность поиск новых методов лечения, предпочтительно затрагивающих базовые механизмы регуляции АД, нежели устранение вторичных симптомов. Поскольку развитие ГБ, наряду с воздействием среды, также в значительной степени обусловлено генетическими факторами, особый интерес представляет коррекция генетических механизмов повышения АД.

В настоящее время ведутся активные исследования терапии различных наследственных заболеваний с помощью изменения экспрессии определённых генов путём введения олигонуклеотидов, содержащих антисмысловые последовательности к данным генам. Этот метод обладает высокой селективностью – антисмысловые последовательности связываются исключительно с комплементарными им участками РНК, тем самым блокируя синтез соответствующего белка.

В данной работе объектом исследования были гипертензивные крысы линии НИСАГ, селекционированные в ИЦиГ СО РАН на

повышение АД в ответ на мягкий эмоциональный стресс. В настоящее время крысы линии НИСАГ широко используются в исследованиях механизмов развития и методов лечения ГБ, поскольку эта модель учитывает как воздействие среды (стресс), так и генетическую предрасположенность к повышению АД. Целью работы было сравнение внутрибрюшинного и ингаляционного методов введения антисмысловых последовательностей к гену ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в комплексе с полилизинном и диоксидом титана. В качестве контрольного препарата использовали синтезированные случайные нуклеотидные последовательности, также в составе комплекса с полилизинном и диоксидом титана.

Учитывая, что АПФ синтезируется в основном в эндотелии лёгочных сосудов, ингаляционный метод введения антисмысловых последовательностей, блокирующих мРНК АПФ, рассматривался как предпочтительный. АД при ингаляционном способе введения снизилось на $22,9 \pm 1,32$ мм. рт. ст. и оставалось сниженным в течение двух недель; внутрибрюшинное введение давало более продолжительный эффект (около трёх недель), хотя уровень АД снижался на меньшую величину: $14,25 \pm 2,3$ мм. рт. ст.

Таким образом, в данном исследовании была показана эффективность терапии ГБ у гипертензивных крыс линии НИСАГ путём ингаляционного и внутрибрюшинного введения антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей к гену АПФ, а также выявлены особенности эффекта различных способов введения препарата.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-15-10073.

Научный руководитель: А.Л. Маркель, д-р биол. наук, проф.

А. И. Стародумова, М. Н. Маслова

*ФГБОУ ВО Нижегородский государственный университет им.
Н.И.Лобачевского*

Starodumovasa@gmail.com

СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА И АКУСТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ *IN VITRO*

Структурные перестройки эритроцитов, в частности, изменения их реологических свойств при гипергликемии, во многом обусловленные гликированием белков крови, могут являться одним из диагностических критериев тяжести патологии и эффективности проводимой терапии. Актуален поиск новых методов быстрой и эффективной оценки структурных перестроек эритроцитов. Широкое применение в клинике нашли безреагентные акустические методы, которые позволяют оценить вязко-эластичные свойства эритроцитов.

Цель представленной работы: исследование акустических параметров эритроцитов и интенсивности гликозилирования белков клеток в условиях моделирования гипергликемии *in vitro*.

Гипергликемию моделировали в цельной крови и суспензии эритроцитов практически здоровых доноров. Модель гипергликемии *in vitro* в цельной крови создавали путем добавления к 1 мл крови 50 мкл растворов глюкозы в физиологическом растворе (0,9 %) до получения концентраций 12,5 ммоль/л, 25 ммоль/л и 50 ммоль/л. Контролем служили образцы с концентрацией глюкозы 5 ммоль/л. Гипергликемию в суспензии эритроцитов создавали путем добавления физиологического раствора с различными концентрациями глюкозы 5 ммоль/л; 12,5 ммоль/л; 25 ммоль/л и 50 ммоль/л к осадку эритроцитов в соотношении 3:1. Контролем служили эритроциты, к которым добавляли физиологический раствор

без глюкозы. Исследования физико-химических параметров эритроцитов проводили через 24 часа после добавления глюкозы к биообразцам при температуре + 4⁰С в закрытых пластиковых пробирках.

Уровень гликогемоглобина определяли с помощью набора «ГЛИКОГЕМОТЕСТ». Измерение упругости эритроцитов проводили акустическим методом на приборе «БИОМ». Анализ эритроцитарных гематологических показателей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior.

При моделировании гипергликемии *in vitro* накопление гликированного гемоглобина выявлено в образцах цельной крови с концентрацией 50 ммоль/л и суспензии эритроцитов при добавлении растворов глюкозы с концентрациями 25 и 50 ммоль/л. Однако, как в цельной крови, так и в суспензии эритроцитов через 24 часа после увеличения концентрации глюкозы до 12,5, 25 и 50 ммоль/л повышается упругость эритроцитов. Гипергликемия различной степени выраженности не вызывает существенных изменений объема эритроцитов и содержания гемоглобина в клетках.

Выявлена прямая зависимость между уровнем гликированного гемоглобина и упругостью эритроцитов в суспензии клеток в процессе моделирования гипергликемии *in vitro*. Однако при моделировании гипергликемии *in vitro* в цельной крови такая зависимость не обнаружена. По всей видимости, повышение упругости эритроцитов в условиях гипергликемии обусловлены гликированием как белков эритроцитов, так и плазменных белков.

Научный руководитель – А. П. Веселов, д-р биол. наук, проф.

И.Х. Хайруллин

Казанский федеральный университет

ilshat.master@gmail.com

ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕННОСТЬ, КАК ОСНОВНАЯ ПРИЧИНА ПОРАЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Сахарный диабет одно из самых распространенных социально значимых заболеваний современного Мира, скорость роста которого имеет эпидемический характер. На основании анализа последних данных можно предположить, что количество пациентов с каждым годом будет прогрессивно расти. В связи с этим, важным и актуальным является выявление ранних признаков поражения головного мозга, определение механизмов и создание рекомендаций по методам коррекции этих поражений.

Материал и методы.

Проведен анализ данных полученных от 120 пациентов, страдающих сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа), которые не имели значимых сердечно-сосудистых заболеваний, перенесенных черепно-мозговых травм, а так же не имели других эндокринных заболеваний. Структура группы: 48 мужчин и 72 женщины, средний возраст $61,22 \pm 8,6$ лет, средняя продолжительность заболевания $10,84 \pm 8,2$ лет. Проведен клинический осмотр пациентов и полное нейрокогнитивное тестирование, которое включало MMSE (Mini- mental State Examination), MoCA тест (Montreal Cognitive Assessment) и TMT A и B (Trial making test part A and B). Средний результат теста MMSE среди пациентов с СД 2 типа - 27 баллов [26;27]: 21 (17,5%) пациентов - 28-30 баллов (норма), а 99 (82,5%) имели когнитивные нарушения (КН): 93 (77,5%) - 24-27 баллов (умеренное КН) и 6 (5%) - 20-23 баллов (выраженные КН). Средний уровень КН среди пациентов с СД 2 типа (по MoCA тесту) 24 балла [22; 26]: 27-30 баллов (норма) - у 23 (19,17%), 13-26 баллов у 97 (80,83%).

Статистический анализ данных выявил, что уровень КН по тестам MMSE и MoCA не имеют значимой корреляции с длительностью заболевания, возрастом пациентов и степенью клинических признаков поражения головного мозга при СД 2 типа. Интересным фактом явилось, что когнитивный резерв имеет ключевое значение в степени сохранности когнитивных функций у этой группы пациентов, что соответствует ранее полученным данным от пациентов с КН другой этиологии. Так выявлено, что у пациентов с высшим образованием результаты тестов статистически значимо выше, чем у пациентов со средне-специальным и ниже образованием ($p > 0,05$). При этом значимо снижались показатели кратковременной памяти и концентрации внимания.

С целью оценки степени брадифрениции был проведен тест ТМТ: средний результат ТМТ-А 53 [38; 67] сек, ТМТ-В 120 [82; 176] сек. При этом 1 пациент не смог выполнить тест ТМТ-А, 42 пациента не смогли выполнить тест ТМТ-В, 65 пациентов выполнили тест с ошибками от 1 до 7. Было выявлено, что скорость мышления у пациентов с СД 2 типа уменьшается, то есть нарастает время выполнения теста, по мере увеличения возраста пациентов.

Заключение: на основании анализа полученных данных был сделан вывод, что состояние пациентов с СД 2 типа усугубляется за счет развития диабетической энцефлопатии, главным признаком которого является когнитивный дефицит. Отсутствие значимой связи с длительностью заболевания, видом терапии и степенью коррекции глюкозы крови позволяет предположить, что основной причиной поражения головного мозга при СД 2 является инсулинорезистентность, коррекция которого в значительной степени может сохранить функции головного мозга, тем самым повысить качество жизни пациентов и улучшить взаимодействие «врач-пациент».

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Д. С. Чулпанова, К. Г. Колобынина, В. В. Соловьева,

А. А. Ризванов

Казанский федеральный университет

daryachulpanova@gmail.com

**ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ
TNFSF10, CSF2, IFNA17, IL2
И ФОСФАТАЗЫ PTEN**

Цитокины представляют собой молекулярные мессенджеры, позволяющие клеткам иммунной системы взаимодействовать друг с другом. Цитокины непосредственно стимулируют иммунные эффекторные и стромальные клетки, тем самым регулируя развитие опухоли и ее микроокружения. Многочисленные *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают иммунологической инертностью и естественным тропизмом к местам локализации опухолей, что делает их перспективными векторами для целевой доставки противоопухолевых агентов. В настоящей работе получены линии МСК из жировой ткани человека со сверхэкспрессией генов фактора некроза опухоли (TNFSF10), интерферона α (IFNA17), интерлейкина-2 (IL2), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF2) и фосфатазы с двойной субстратной специфичностью (PTEN).

На первом этапе работы проводили субклонирование целевых генов из вектора-донора pDONR221 в лентивирусный плазмидный вектор pLX303 (Addgene) методом LR-рекомбинации по технологии Gateway (Invitrogene) Продуктами рекомбинации трансформировали

компетентные клетки *E. coli*. Методом ПЦР-скрининга колоний с использованием ген-специфичных праймеров отбирали положительные клоны и выделяли из них плазмидную ДНК. Правильность сборки плазмидных конструкций была проанализирована рестрикционным анализом с эндонуклеазами рестрикции *KpnI* и *XhoII* (Thermo Fisher Scientific) и секвенированием.

Рекомбинантные лентивирусы были получены путем ко-трансфекции пакующей линии клеток HEK293FT и сконцентрированы ультрацентрифугированием при 26 000 об/мин. Вирусный титр определяли методом проточной цитофлуориметрии по флуоресценции контрольных клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP).

МСК из жировой ткани человека были модифицированы рекомбинантными лентивирусами, кодирующими гены IFNA17, TNFSF10, PTEN, CSF2, IL-2 и GFP с множественностью инфекции (MOI) 10. После генетической модификации была проведена селекция трансдуцированных клеток путем культивирования с антибиотиком бластицидин S. Сверхэкспрессия целевых генов в МСК после селекции была подтверждена с помощью ПЦР-РВ.

В дальнейшем планируется исследование противоопухолевой активности МСК со сверхэкспрессией TNFSF10, IFNA17, IL2, CSF2 и PTEN в культуре опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Научный руководитель – В. В. Соловьева, канд. биол. наук

АНАЛИЗ МЕЖСИСТЕМНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА У КРЫС

Травматическая болезнь спинного мозга (ТБСМ) обусловлена большой распространенностью, инвалидизацией и высокой смертностью пострадавших. Травма спинного мозга вызывает прямое механическое повреждение тканей (первичное повреждение) и биохимические изменения, которые вызывают прогрессирующую потерю клеток (вторичная травма). Вторичные травмы, в том числе отек, воспаление, эксцитотоксичность и нарушение аксонов, способствуют апоптозу нейронов, который играет важную роль в физическом и функциональном нарушении после ТБСМ. Это явление дополнительно приводит к постоянному повреждению ткани вокруг эпицентра места повреждения. Хотя точные молекулярные механизмы вторичного повреждения остаются неясными, блокирование или ослабление вторичной гибели нейронов может способствовать ограничению посттравматических последствий.

Апоптоз и аутофагия - это два эволюционно сохраняющихся процесса, которые поддерживают гомеостаз во время стресса. Хотя эти два пути используют принципиально различные механизмы, апоптоз и аутофагия тесно взаимосвязаны и имеют множество ключевых регуляторов. При апоптозе высвобождается цитохром С из митохондрий, что приводит к активации Caspase 3 и к последующей трансактивацией прокаспазы-9 на Араф-1. Каспаза-3 экспрессируется в поврежденной ткани и вызывает вторичные повреждения приводящие к апоптозу. Каспаза-8 и 9 являются каспазами

инициатора рецептора смерти и митохондриально-зависимого пути. Апоптоз через митохондриальный сигнальный путь приводит к демиелинизации, дегенерации аксонов и неврологической дисфункции после травмы спинного мозга. Активация каспаз рассматривается как один из ранних маркеров апоптоза.

Аутофагия представляет собой лизосомозависимый клеточный катаболический путь, который служит для деградации цитоплазматических белков, белковых агрегатов и органелл. Стимуляция аутофагии обеспечивает нейрозащитный эффект, однако, повышенная экспрессия аутофагических маркеров, таких как LC3B и аутофагосомы, коррелирует с повышенной гибелью клеток. Следовательно, роль аутофагии остается спорной в процессах ТБСМ.

Пересекающиеся функциональные пути между апоптозом и аутофагией многообразны. В определенной клеточной среде аутофагия функционирует как стресс-ответ для подавления апоптоза и способствует выживанию клеток, так в других условиях, аутофагия может служить в качестве механизма каспазы-зависимой или независимой клеточной смерти.

Следовательно, роль аутофагии и апоптоза остается спорной, и лучшее понимание их в процессах ТБСМ поможет нам разработать новые терапевтические стратегии. На сегодняшний день нет фармакологического лечения, доступного для ТБСМ с доказанной эффективностью.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ - 17-04-01746 а.

Научный руководитель - Т. В. Балтина - канд. биол. наук, доцент.

G. O. O. Hassan, N.S. Karamova

Kazan Federal University

gamal_micro84@yahoo.com

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SUCCESSIVE EXTRACTS
OF THYMUS CAPITATUS AGAINST RESPIRATORY TRACT
INFECTIONS BACTERIA**

Plants produce secondary metabolites as a response to adverse environmental conditions or in particular developmental stages. These secondary metabolites can be used for treatment of infectious diseases. Thymus species are used in traditional medicine as tonic, antiseptic, antitussive and carminative agents as well as in cosmetic and perfume industry, for the preservation of several food products or as spice. Pathogenic microorganisms and multi-drug resistant strains of bacteria cause mortality in many developed countries. The emergence and spread of antibiotic resistant bacteria resulted in the formation of untreatable bacterial infections. Plants are considered new resources for synthesis agents acting as alternatives to antibiotics in the treatment of infectious diseases.

Five successive extracts of *Thymus capitatus* (water, hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol extracts) at different concentrations were tested for antibacterial activity against bacteria isolated from respiratory tract of patients admitted to hospitals in Egypt. The highest antibacterial effect was obtained for hexane extract, which inhibited the growth of the most tested bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Candida tropicalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Chloroform and ethyl acetate extracts did not inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. Water and ethanolic extracts showed the least antibacterial activity among all the extracts against all the tested bacteria.

Supervisor – N.S. Karamova, Ass. Prof, Candidate of Biol. Sciences.
(доцент, канд биол. Наук).

I. M. Ibrahim¹, E. N. Sigida²

¹ *Saratov State University,*

² *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms*

Russian Academy of Sciences, Saratov

ibrahim.egypt2016@yandex.ru

**CHARACTERIZATION AND OPTIMIZATION OF PRODUCTION
OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM BACILLUS LICHENFORMIS
STRAIN EG1QL30 ISOLATED FROM LAKE QARUN,
FAYOUM, EGYPT**

Halotolerant bacteria and halophiles secrete exopolysaccharides (EPSs) as a system of adaptation for growth, adhering to solid surfaces, and to still survive adverse unsuitable conditions. Bacterial EPSs have complex structures and exhibit wide range of biological activities, including antitumor, antioxidant, antiviral, immunostimulating activities etc.

At present work we studied an EPS producer, haloalkaliphilic, thermophilic strain EG1QL30, isolated from salt sample collected from Lake Qarun, Fayoum, Egypt. Morphological characterization of this strain was examined. The cells of strain EG1QL30 were observed to be Gram-stain positive, spore-forming motile rods. The colonies of strain EG1QL30 grown on SG medium were observed to be cream-colored, slimy and of irregular shape. Strain EG1QL30 was able to utilize an average range of organic substrates. The strain EG1QL30 was characterized and identified as *Bacillus licheniformis* with similarity 99% based on 16S rRNA gene sequencing and phenotypic characterization.

The optimal conditions for growth of strain EG1QL30 were tested in a SG broth medium in presence of different carbon sources (sucrose, glucose, lactose, fructose and mannose) The strain grew optimally at pH 7 (pH growth range pH 5–10) with 5% NaCl (NaCl growth range 0–25%) at 35°C (temperature growth range 20–50 °C) in presence of 1% (growth

range 1-4%) of glucose among the different carbon sources. Strain EG1QL30 grew optimally at 5% NaCl but it couldn't grow at higher NaCl concentrations, so it could be considered as halotolerant bacterium.

The optimum temperature, pH, NaCl concentration, carbon source and carbon source concentration for EPS production were determined to be 30°C, 8, 5%, sucrose and 3%, respectively. Seventy two hours of incubation period was found to be an optimum for production of maximum yield of EPS. The actual yield of EPS under these conditions was 9.235 gL⁻¹.

For EPS isolation, the cells were harvested by centrifugation (40 min, 4000 ×.g), and the supernatant was treated with 95% chilled EtOH (vol. 1:3). The precipitated EPS thus obtained was resolved in distilled water and purified by repeated reprecipitation followed by dialysis.

Gel-permeation chromatography of the EPS on Sepharose CL-6B and anion-change chromatography on Toyopearl DEAE-650M followed by monosaccharide analysis by GLC of acetate polyols and TLC revealed that strain EG1QL30 produces three different EPSs: EPS1 (neutral), which consists of mannose/ glucose/ rhamnose/ galactose/ glucosamine/ xylose in a relative ratio 1.0:0.81:0.43:0.22:tr:tr, EPS2 (charged), composed of mannose/ glucose/ arabinose/ galactose/ rhamnose/ xylose (1.0:0.86:tr:tr:tr:tr) and EPS3 (charged) composed of galactose/ glucose/ glucosamine/ mannose/ arabinose/ xylose/ rhamnose (1.0:0.33:0.13:0.10:tr:tr:tr).

Scientific supervisor – Prof. Dr. Sci. of Biology S.A. Konnova, Saratov State University.

УДК 579.22

Daria A. Korsun, Alexey A. Potekhin

Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, Russia

korsundaria@mail.ru

**CROSS-TALK BETWEEN PARAMECIUM AND ITS SYMBIONT
HOLOSPORA CARYOPHILA: INITIAL OBSERVATIONS
AT EARLY INFECTION STAGES**

Associations *Paramecium* – *Holospira* are excellent models to study symbiotic relationships at the early stage of their emergence, during formation of symbiotic system (SBS). Infectious symbiotic bacteria of genus *Holospira* are obligatory endonucleobionts with complex life cycle. Successful formation of SBS is strictly dependent on genotype compatibility of both partners (Rautian et al. 1993, Bella et al., 2016). The critical steps of infection development are characterized by specific interactions between symbiont and host. As a result, symbiosis formation can be blocked at several stages (Skoblo et al. 1996, 1998). Genetic analysis of a cross-talk between ciliate and bacteria has never been performed.

Our research focused on symbionts *Holospira caryophila*, the only bacterium able to infect macronuclei of many species of the *Paramecium aurelia* complex. A total of 18 *Paramecium* strains belonging to *P. tetraurelia* and its closest relative, *P. octaurelia*, were used in the study. The aim of the study was to determine the blocks in SBS development and, thus, to figure out the infection stages of *H. caryophila*. As in other studied *Holospira* species, we found several blocks of *H. caryophila* infection development. In seven strains we observed characteristic blocks at the stage of food vacuole formation or at the stage of cytoplasmic transport of the symbiont to the macronucleus. These strains lose bacteria within 24-48 hours post-infection. In three clones the infectious forms (IFs) rapidly appear in macronucleus within 6 hrs post-infection, but then we could not observe reproductive forms (RFs) in infected cells. In four strains symbionts enter macronucleus and

differentiate from IF to RF, but on the 5th day after experimental infection all RFs are completely lost from macronucleus. In four strains the infectious cycle can be successfully completed in 12-14 days after experimental infection, when new generation of IFs appears in macronucleus. Two of these strains are able to develop a stable SBS, while two other strains still lose symbionts within few weeks. This description of early infection stages will hopefully further allow to make genetic analysis of the infection process and to prepare a time course of infection for transcriptomics.

Supported by RSF 16-14-10157. Work facilities provided by RRC “Culture Collections of Microorganisms” (St Petersburg State University, Russia).

Scientific director – Alexey A Potekhin, Prof. Dr., Saint Petersburg State University, Faculty of Biology, Department of Microbiology.

УДК 579.222.2

Г.А. Бажутин¹, Е.А. Тюмина²

¹*Пермский государственный*

гуманитарно-педагогический университет

²*Пермский государственный национальный*

исследовательский университет

e-mail: sniffedbybadger@gmail.com

СКРИНИНГ АКТИНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ – БИОДЕСТРУКТОРОВ ИБУПРОФЕНА

Интенсивное развитие фармацевтики сопряжено не только с появлением новых лекарственных средств, но и загрязнителей нового класса – фармацевтических поллютантов. Эти вещества с высокой устойчивостью их химической структуры и выраженной биологической активностью обнаруживаются в почве, поверхностных, подземных и сточных водах, что представляет большую угрозу для окружающей природной среды. Традиционные методы удаления фармпрепаратов и их метаболитов в процессе очистки сточных вод малоэффективны и экологически не безопасны. Распространение загрязнителей данного

класса стало проблемой мирового масштаба. В настоящее время актуален поиск альтернативных способов детоксикации и выведения фармполлютантов из открытых экосистем.

Среди микроорганизмов, обладающих наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов, выделяются актинобактерии. Целью настоящей работы является исследование возможности использования данной группы микроорганизмов в качестве эффективных биоокислителей фармполлютантов, наиболее часто детектируемых в окружающей среде, на примере ибупрофена.

Ибупрофен ((RS)-2-(4-изобутилфенил)-пропионовая кислота, CAS: 15687-27-1), – лекарственное средство из группы производных пропионовой кислоты, обладающее болеутоляющим и жаропонижающим действием. В работе использовали 122 штамма актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, реестровый номер Уникальной научной установки 73559, номер 768 во Всемирной федерации коллекции культур, www.iegm.ru/iegmcol/strains), принадлежащие к родам *Actinobacter*, *Brachy bacterium*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Dermacoccus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Williamsia*. Скрининговые исследования проводились в иммунологических планшетах (8x12) с использованием минеральной среды с ибупрофеном в качестве единственного источника углерода. Инкубация планшетов производилась в течение 2 сут на орбитальном шейкере (450 об/мин, 24°C). Измерение оптической плотности производили на планшетном спектрофотометре Multiscan Ascent (Thermo labsystems, Финляндия) с применением фильтра 630 нм.

По нашим данным, представители родов *Dermacoccus*, *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* обладают повышенной устойчивостью к воздействию ибупрофена. Отобраны штаммы *Der. nishinomiensis* ИЭГМ 393, *D. maris* ИЭГМ 297, ИЭГМ 302, ИЭГМ 459, *G. terrae* ИЭГМ 153, *R. erythropolis* ИЭГМ 711, *R. ruber* ИЭГМ 596, проявляющие устойчивость

к сравнительно высоким концентрациям (от 0,01 до 0,005%) ибупрофена в среде культивирования бактериальных клеток.

Исследования поддержаны грантом Российского фонда фундаментальных исследований (N 17-44-590567).

Научный руководитель – д.б.н., акад. РАН. И. Б. Ившина.

УДК 579.262

И. В. Войцеховская, Д. В. Аксёнов-Грибанов,
Е. С. Протасов, М. Д. Димова, М. А. Тимофеев

¹*Научно-исследовательский институт биологии, Иркутск*
irina.voytsekhovskaya@gmail.com

АНАЛИЗ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ШТАММОВ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭНДЕМИЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ *B. BAIKALENSIS*

Актинобактерии являются эффективным источником биологически активных соединений. В настоящее время известно около 10 000 антибактериальных соединений, продуцируемых актинобактериями одного только рода *Streptomyces*, в то время как общее число противомикробных соединений составляет 18 000. Однако, ввиду того, что большинство экосистем планеты широко исследованы, малоизученные и древние экосистемы выступают уникальным и перспективным источником для выделения новых штаммов бактерий - продуцентов новых природных соединений. Одной из таких необычных и неисследованных экосистем планеты является древнейшее пресноводное озеро Байкал, фауна которого насчитывает более 2 600 видов, 80% из которых являются эндемиками.

Целью данного исследования являлся скрининг и филогенетический анализ культивируемых штаммов актинобактерий, обитающих в байкальских эндемичных макробеспозвоночных, а также анализ их антибиотической активности.

В ходе данной работы из байкальских эндемичных моллюсков *Benedictia baicalensis* (Gerstfeldt, 1859), собранных с глубин 50, 100 и 150 м, было выделено 87 штаммов актинобактерий. Из них 66 штаммов

относились к роду *Streptomyces*. Иные штаммы представлены редкими и нетривиальными родами, в т.ч.: 8 – к роду *Micromonospora*, 5 – к роду *Rhodococcus*, 5 – к роду *Nocardia*, 1 – к роду *Janibacter*, 1 – к роду *Saccharopolyspora* и 1 – к роду *Actinomadura*. Выделенные штаммы культивировали глубинно на трех жидких питательных средах различного состава для последующего выделения экстрактов. Активность экстрактов была проанализирована с применением диск-диффузионного метода против различных тест-культур грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Установлено, что среди выделенных штаммов, 22 изолята подавляли рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Специфическую антибиотическую активность против грамотрицательных бактерий проявили 10 штаммов (*Streptomyces* sp. IB2015A90-9, *Streptomyces* sp. IB2015A90-28, *Streptomyces* sp. IB2015A91-1, *Streptomyces* sp. IB2015A93-21HS, *Streptomyces* sp. IB2015A95-14, *Streptomyces* sp. IB2015A97-2HS, *Micromonospora* sp. IB2015A98-4, *Streptomyces* sp. IB2015A99-1, *Rhodococcus* sp. IB2015A99-3, *Streptomyces* sp. IB2015A100-2), в то время как 5 штаммов (*Streptomyces* sp. IB2015A90-8, *Streptomyces* sp. IB2015A95-12, *Streptomyces* sp. IB2015A98-3HS, *Streptomyces* sp. IB2015A100-1, *Streptomyces* sp. IB2015A100-11) ингибировали рост грамположительных тест-культур. Широкий спектр антибиотической активности как против бактерий, так и против грибов продемонстрировали 14 штаммов. Среди выделенных штаммов актинобактерий, четыре штамма обладали противогрибковой активностью.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что активные штаммы актинобактерий, выделенные из эндемичных моллюсков *B. baikalensis*, являются перспективными объектами для дальнейшего изучения и оценки их биосинтетического потенциала.

Настоящее исследование проведено при финансовой поддержке грантов МИНОБРНАУКИ РФ (6.9654.2017/8.9), РФФИ (16-34- 60060, 16-34-00686), ФГБОУ ВО «ИГУ» и Германской службой академических обменов.

А.О. Воронина¹, Е.С. Корсакова^{1,2}, Л.Н. Ананьина¹,
Е.Г. Плотникова^{1,2}

¹ *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
г. Пермь*

² *Пермский государственный национальный исследовательский
университет
voroninaao@gmail.com*

ГЕНЫ ДЕСТРУКЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ОТХОДАМИ КАЛИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА (Г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

В результате промышленной деятельности человека увеличивается поступление в окружающую среду моно- и полиароматических соединений (таких как, фенолы, бензол, толуол, фталаты, бифенилы и др.), которые устойчивы к внешним воздействиям, обладают токсичностью и канцерогенными свойствами, что представляет существенную опасность для здоровья человека и биосферы в целом. Большое количество таких соединений обнаруживается в отходах горнодобывающих производств, образующихся в результате разработки Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (г. Березники).

Цель настоящей работы – оценить разнообразие ключевых генов деструкции ароматических поллютантов (в частности, бифенила) в микробном сообществе почвы, загрязненной отходами калийного предприятия, охарактеризовать таксономический состав сообщества и выделить активные бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ из исследуемой почвы.

Из образцов загрязнённой почвы, отобранной вблизи солеотвала предприятия БКПРУ-3 на среде К1 с бифенилом (1 г/л) была получена накопительная культура (НК). В результате проведенного исследования с выделенной тотальной ДНК (при использовании праймеров к гену α -

субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы) был получен ПЦР-продукт, который был проклонирован в клетках *E. coli* JM109 в составе плазмиды pTZ57R. На основании полученных данных, после определения и анализа последовательностей клонированных участков ДНК, можно предположить, что в исследуемом микробном сообществе основная роль в деструкции ароматических соединений (в том числе, бифенилов) принадлежит бактериям, содержащим гены трех типов диоксигеназ: бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA*), изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (*ipbA*) и диоксигеназы, гидрокселирующей ароматическое кольцо (*arhD*). Таким образом, полученные результаты указывают на участие гетерогенных генетических систем бактерий исследуемой загрязненной почвы района соледобычи в разложении бифенила (хлорированных бифенилов) и ряда других моно(поли)ароматических соединений.

Методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза в исследуемой НК выявлены гены 16S рНК бактерий родов *Acidobacterium*, *Sphingobacterium*, *Flavobacterium* и *Rhodococcus*.

Параллельно, из образцов исследуемой почвы был выделен штамм KBV16, способный использовать в качестве ростового субстрата бифенил. На основе анализа гена 16S рНК штамм отнесен к роду *Rhodococcus* (уровень гомологии с типовым штаммом вида *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T – 100%). Методом ПЦР установлено наличие у этого штамма гена *bphA1*, гомологичного (99% сходства) гену *bphA1* некультивируемых бактериальных клонов и известных штаммов-деструкторов бифенила/полихлорированных бифенилов рода *Rhodococcus*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология», проект №15-4-4-13.

Научный руководитель – д-р биол. наук Е.Г. Плотникова.

УДК 579.6

О. Н. Гагарских¹, О. В. Ястребова²

¹ Пермский государственный национальный
исследовательский университет

² Институт экологии и генетики микроорганизмов

УрО РАН, г. Пермь

gagarskih.olga@yandex.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА- ДЕСТРУКТОРА ФТАЛАТОВ *ARTHROBACTER SP. PD13-12*

В значительных количествах фталаты обнаружены в отходах калийного производства Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (Пермский край). Данные соединения представляют опасность для здоровья человека и животных в связи с токсичными и канцерогенными свойствами.

Разложение фталатов может осуществляться как с помощью химических методов, так и биологическими методами (микробная деструкция). Среди штаммов, осуществляющих аэробную деструкцию фталатов, обнаружены бактерии различных филумов, в том числе представители рода *Arthrobacter*.

Цель работы – характеристика штамма *Arthrobacter sp. PD13-12*, выделенного из района солеразработок (г. Березники, Пермский край), способного к деструкции *орто*-фталевой кислоты (*орто*-ФК) и дибутилфталата (ДБФ).

Из образца донных отложений промышленных стоков промканала (ПАО “Уралкалий”, г. Березники) выделен бактериальный штамм PD13-12, способный к росту на *орто*-ФК, ДБФ (1 г/л) в минеральной среде с NaCl (30 г/л). Данный штамм растет при содержании 0 - 70 г/л NaCl в среде культивирования и относится к галотолерантным микроорганизмам.

На основании анализа гена 16S рРНК наибольший уровень гомологии (99,65% сходства) данный штамм проявляет с типовым штаммом *A. pascens* DSM20545^T (группа *Arthrobacter globiformis*).

Установлено, что штамм *Arthrobacter* sp. PD13-12 способен к росту на моно- и полиароматических углеводородах (бензоате, салицилате, нафталине, бифиниле), что свидетельствует о широкой субстратной специфичности. Кроме того, штамм PD13-12 растет на протокатеховой кислоте (ПКК) – ключевом метаболите *орто*-ФК.

Известно, что микробная деструкция сложных эфиров фталевой кислоты, в том числе ДБФ, осуществляется через стадии образования *орто*-ФК и ПКК в качестве основных интермедиатов, с дальнейшим расщеплением ароматического кольца по *мета*- или *орто*-пути.

Анализ профиля метаболитов деструкции *орто*-ФК, полученных в экспериментах с «отмытыми» клетками штамма, показал присутствие в культуральной среде штамма 3,4-дигидроксифталевой кислоты. Утилизация *орто*-ФК штаммом составляла 100% к 24 часам культивирования.

На основании полученных результатов можно предположить, что деструкция *орто*-ФК штаммом PD13-12 происходит с разложением через стадии образования 3,4-дигидроксифталевой и протокатеховой кислот, как показано для ряда грамположительных бактерий, в том числе рода *Arthrobacter*.

Штамм PD13-12 эффективно растет в минеральной среде с *орто*-ФК и ДБФ при повышенном содержании NaCl. Наиболее высокие ростовые показатели наблюдались при культивировании штамма в присутствии 30 и 50 г/л NaCl.

Таким образом, штамм PD13-12 способен к эффективной деструкции фталатов в условиях повышенного засоления среды. Данный штамм является перспективным для разработки новых методов биоремедиации засоленных почв, загрязненных *орто*-ФК и ее производными.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 16-44-590968 р_а. Научный руководитель – Е. Г. Плотникова, д-р биол. наук.

Д.Ф. Гайсина, П.В. Ильясов

*Самарский научно-исследовательский ветеринарный институт –
филиал Федерального исследовательского центра*

вирусологии и микробиологии

gdf1995@mail.ru

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОФИЛЕЙ РЕСПИРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

К настоящему времени известно большое количество методов бактериологической диагностики. Они обеспечивают достаточно надежную идентификацию микроорганизма, однако характеризуются высокой стоимостью и требованиями к персоналу, либо продолжительным временем выполнения процедур. Перспективным направлением является разработка метода обнаружения микроорганизмов на основе регистрации их респираторной активности. Такой подход должен обеспечить ускоренную и более точную идентификацию микроорганизмов по сравнению с традиционными методами при минимальных затратах.

Цель работы: получение профилей респираторной активности бактерий в ответ на панель субстратов в рамках разработки нового метода бактериологической диагностики.

Материалы и методы исследования. Научные исследования проводились на базе отдела инвазионных заболеваний ФГБНУ Самарская НИВС. Клетки бактерий выращивали на ГРМ-агаре в течение 12-26 ч при 37 °С. Биомассу собирали петлей, центрифугировали при 6000 g, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в физиологическом растворе. Полученные клетки иммобилизовали путем адсорбции на фильтрах Whatman™ GF/A. Фрагмент носителя с иммобилизованными клетками помещали на рабочую поверхность

датчика кислорода и фиксировали с помощью капроновой сетки и прижимного кольца. Датчик кислорода с клетками помещали в кювету, содержащую рабочий раствор и установленную на магнитной мешалке. После установления равновесной концентрации кислорода в кювету вносили раствор субстрата из расчета 10 мМ концентрации субстрата в кювете и регистрировали сигнал датчика. Обработку сигналов и математико-статистические расчеты осуществляли с помощью приложения MS Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение. На первом этапе выполнили предварительную стандартизацию условий измерения с использованием штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus warneri*. Установлено, что оптимальные параметры подготовки биомассы и измерения включали: культивирование на ГРМ-агаре в течение 15-17 ч, иммобилизация сорбцией на фильтре GF/A, количество иммобилизованных клеток $(2-5) \times 10^{10}$, использование в качестве рабочего раствора PBS с концентрацией солей 50 мМ и pH 7,1-7,2. В дальнейшем с использованием панели из 10 субстратов получили метаболические профили *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. warneri*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. sciuri*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* из рабочей коллекции культур ФГБНУ СамНИВС. Полученные профили достоверно воспроизводились в пределах культуры и не совпадали ни для одной пары исследованных культур; значения коэффициента корреляции составляли не более 0,85 и в большинстве случаев составили менее 0,7. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность использования профилей респираторной активности микроорганизмов в бактериологической диагностике. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение и дополнение списка субстратов профиля, обеспечивающего получение полноценной информации о биохимических характеристиках микроорганизма и однозначную идентификацию его видовой принадлежности.

Научный руководитель - канд. биол. наук П.В. Ильясов.

УДК 578

Р. Р. Гареев^{1,2}, Е. А. Климов¹, Е. И. Ярыгина²,
З. Г. Кокаева¹, А. В. Королев²

¹ *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина*

² *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

gareev_3_3@mail.ru

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ МАССОВУЮ БЕССИМПТОМНУЮ ГИБЕЛЬ СЕМЕЙ ПЧЕЛ, НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ И БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Пчелы, как и другие представители животного мира, подвержены вирусным заболеваниям. Опасность вирусов обусловлена их длительным существованием в организме хозяина без клинической симптоматики, быстрым распространением как в пчелиной семье, так и вне ее, наличием эктопаразитов-переносчиков. Знание причин, условий и общих закономерностей развития болезни поможет минимизировать последствия инфицирования пчелиных семей.

Бессимптомность, сосуществование вирусов, высокая плотность популяции, наличие биологических переносчиков — факторы, способные превратить вирусы в серьезную угрозу. Именно с вирусами связывают «коллапс» пчелиных семей, характеризующийся быстрым исчезновением взрослых особей при сохранении расплода, достаточном количестве корма и на фоне низкого уровня клещевого паразитизма.

В данной работе изучено распространение вирусов пчел, а именно вируса деформации крыла - DWV, кашмир вируса - KBV, вируса черных маточников - BQCV и израильского вируса острого паралича - IAPV, в Ростовской и Белгородской областях Российской Федерации.

Для выполнения поставленной задачи проведена оценка индикации вирусов в пробах из вышеуказанных областей. Для оценки присутствия вирусов прибегли к молекулярно-генетическому анализу:

- 1) Подготовка образцов для выделения тотальной РНК;
- 2) Выделение тотальной РНК;
- 3) Проведение реакции обратной транскрипции;
- 4) Оценка присутствия вирусов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- 5) Электрофоретический анализ продуктов ПЦР.

В результате из всех образцов была выделена тотальная РНК. Для всех образцов была получена комплементарная ДНК, которая использовалась в дальнейшем ПЦР-анализе.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Распространенность вирусов по областям

Область	IAPV	DWV	BQCV	KBV
Ростовская	-	+	+	-
Белгородск ая	+	-	+	+

Таким образом, проведенные исследования показали, что в Ростовской области присутствуют вирус черных маточников и вирус деформации крыла. В то время как в Белгородской области установлено присутствие всех вирусов кроме, единственного, вируса деформации крыла.

Научный руководитель: Е.И. Ярыгина д-р. биол. наук, проф.

А.С. Горбунова, И.В. Хиляс, Ю.Д. Романова,
Г.Ю. Яковлева

Казанский федеральный университет

GorbunovaAnna94@gmail.com

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ *BACILLUS PUMILUS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА

2,4,6-тринитротолуол (ТНТ) является опаснейшим из загрязняющих веществ вследствие наличия у него мутагенных свойств и устойчивости к биодegradации. Наиболее действенным и ненаносящим вреда окружающей среде является биологический метод трансформации ТНТ с помощью микроорганизмов, что объясняется наличием у них ферментных систем деградации ксенобиотиков. Известно, что токсический эффект на микроорганизмы-деструкторы проявляется в подавлении роста культуры, изменении морфологии клеток, подавлении дыхания, снижении трансмембранного потенциала и т.д. Однако, до конца остается невыясненным вопрос действия ксенобиотика на белковый профиль микроорганизма-деструктора.

В связи с этим, посредством двумерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии нами был проведен анализ изменения протеомного профиля *Bacillus subtilis* SK 1 под действием ТНТ (20, 200 мг/л) на 4 час культивирования. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ионообменной хроматографии (ИОХ) были идентифицированы продукты трансформации данного нитроарила.

Сравнительный протеомный анализ продемонстрировал, что при действии ТНТ в концентрации 20 мг/л визуально наблюдается подавление продукции лишь 3 белков, тогда как ТНТ в концентрации 200 мг/л ингибировал экспрессию - 38. При действии высокой концентрации ксенобиотика, кроме ингибируемых белков, были протектированы 26 белков, которые индуцировались в присутствии ТНТ. Среди индуцируемых белков *B. subtilis* преобладали белки,

ответственные за восстановительный путь трансформации ксенобиотика, снятие окислительного стресса и репарацию молекулы ДНК и клеточной стенки. В числе ингибируемых ТНТ белков отмечались белки характерные для клеток, находящихся на стадии активного роста.

В ходе протеомного анализа большинство белков *B. subtilis* было идентифицировано как белки *B. pumilus*. Поэтому для уточнения таксономического положения штамма *B. subtilis* был проведен генетический анализ с помощью сиквенса 16S рРНК. Согласно проведенному скринингу по базе данных GenBank, наиболее близкими к полученной последовательности гена 16S рРНК к штамму оказались штаммы вида *B. pumilus*.

Научный руководитель – Г.Ю. Яковлева, канд. биол. наук., доцент.

УДК 57.083

Я. Я. Тыньо, А. А. Дурманова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина
yutyinio@mail.ru

ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПЦР

На сегодняшний день всё более актуальным становится проведение доклинических испытаний не на лабораторных животных, а на различных типах клеточных культур, которые являются универсальными моделями для изучения различных видов воздействия на клетки. Методы оценки противовирусной активности препаратов *in vivo* позволяют помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного

исследования новых препаратов, прежде всего на стадии их доклинических испытаний.

Цель данной работы — разработка протокола по оценке противовирусной активности препаратов *in vitro* с использованием метода ПЦР. В частности, была поставлена задача разработки протокола для оценки противовирусной активности препарата «Аллокин-альфа» на культурах клеток сельскохозяйственных животных.

«Аллокин-альфа» — противовирусный препарат, главным действующим веществом которого является аллоферон - олигопептидная молекула из 13 аминокислот, которая выступает индуктором синтеза интерферонов, активатором системы НК-клеток и локально, в присутствии антигена, активатором системы естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, а также способствует восстановлению функциональной активности Т-клеточного иммунитета.

В ходе разработки протокола был проведен анализ баз данных культивируемых вирусов и поиск целевого вируса. Изначально предпочтение отдавалось вирусам крупного рогатого скота семейства *Herpesviridae*. Далее к целевому вирусу по тропности подбирали культуры клеток, а также анализировали рынок диагностических наборов ПЦР для индикации и идентификации целевого вируса.

Для выделения ДНК из клеток производили лизирование клеточной культуры. Клеточный осадок удаляли центрифугированием. Затем белки денатурировали с помощью протеаз и осаждали с помощью органических растворителей. Очищенную ДНК извлекали путем осаждения с использованием этанола или изопропанола. Далее проводилась ПЦР диагностика выделенной ДНК.

Оценка противовирусной активности препаратов сводится к контролю репродукции вируса. Инфекционную активность вируса определяли полимеразной цепной реакцией в реальном времени. Преимущества данного метода заключаются в высокой специфичности, чувствительности, скорости получения результата анализа, универсальности процедуры выявления различных возбудителей.

Таким образом, был разработан протокол по оценке противовирусной активности препаратов *in vitro* с использованием метода ПЦР в реальном времени, позволяющий максимально точно определять содержание вируса в клеточной культуре при различных условиях постановки эксперимента.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 579.234

С. С. Евстигнеева, Е. Н. Сигида, В. С. Гринёв

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов

РАН, г. Саратов

Stels20295@yandex.ru

СТРУКТУРА ЛИПОПОЛИСАХАРИД-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА КАПСУЛЫ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245 – ФАКТОРА ФОРМИРОВАНИЯ АССОЦИАЦИИ С РАСТЕНИЯМИ

Дiazотрофные бактерии р. *Azospirillum* имеют важное биотехнологическое значение, в связи со способностью формировать взаимовыгодные ассоциации со многими злаковыми культурами, стимулируя их рост и урожайность. В образовании ризоэкоценоза азоспириллы-растение принимают участие бактериальные гликополимеры, в частности полисахариды капсулы. Известно, что азоспириллы продуцируют в капсулу липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК). Изучение структуры и свойств ЛПБК важно для понимания ключевых этапов образования растительно-микробной ассоциации на молекулярном уровне. В связи с этим целью работы было установление структуры ЛПБК бактерий *A. brasilense* Sp245.

Бактерии *A. brasilense* Sp245 выращивали в малатной питательной среде при 30 °С до окончания экспоненциальной фазы роста. Выделение ЛПБК с поверхности клеток и его очистку

проводили, как описано ранее Konnova et al. (1994). Выход ЛПБК в расчете на сухую биомассу клеток составил 1 %.

По результатам ДСН-ПААГ-электрофореза в составе препарата ЛПБК были обнаружены углеводсодержащие компоненты с характерным для липополисахарида (ЛПС) этих бактерий профилем. С использованием окрашивания кумасси бриллиантовым голубым R-250 в составе ЛПБК были выявлены два полипептида с кажущейся M_r 42 и 30 кДа, в соотношении ~ 5 : 1.

Полисахарид (ПС) из ЛПБК получали мягким кислотным гидролизом и последующей гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50. Выход ПС составил 25 % от массы ЛПБК. На основании моносхаридного состава ЛПБК и анализа методом ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектроскопии установлено, что структура повторяющегося звена ПС из ЛПБК идентична установленной ранее структуре повторяющегося звена О-полисахарида данного штамма: $\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow$

Белковые компоненты ЛПБК после разделения в ПААГ были экстрагированы из геля и проанализированы MALDI масс-спектрометрией на приборе Bruker Ultraflex extreme с использованием программного обеспечения Mascot версии 2.4.2 (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) в базе данных последовательностей белков UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Исследуемые белки были идентифицированы как порин OmaA (41 кДа) и канал-образующий OmpW-подобный белок (25 кДа). OmaA является основным белком наружной мембраны и выполняет функцию адгезина при агрегации клеток и колонизации растений.

На белок OmaA были получены поликлональные кроличьи антитела, с использованием которых методами двойной радиальной иммунодиффузии, ИФА, иммуноблоттинга в ЛПБК двенадцати штаммов трех видов азоспирилл – *A. brasilense*, *A. lipoferum* и *A. halopraeferens* – была выявлена консервативность антигенных детерминант данного белкового компонента ЛПБК.

Таким образом, была доказана идентичность структур ПС в составе ЛПС и ЛПБК *A. brasilense* Sp245, а также идентифицированы два белка ЛПБК – OpaA и OmpW, принимающие непосредственное участие в реализации молекулярных механизмов формирования ассоциаций азоспирилл с растениями.

Научный руководитель – канд. биол. наук, доцент Ю.П. Федоненко.

УДК 614.9:636.09

Я. Я. Тыньо, М. А. Егорова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина
yutynio@mail.ru

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА

Лептоспироз — природно-очаговое зоонозное инфекционное заболевание — наносит огромный ущерб молочному и мясному скотоводству, приводя к рождению слабого, нежизнеспособного потомства, бесплодию самок, абортam, снижению продуктивности быков-производителей.

Современные методы клинической диагностики, основанной на комплексе микробиологических и серологических методов, использовании их в различных комбинациях в зависимости от фазы заболевания и его тяжести, позволяют успешно диагностировать стадию лептоспироза и своевременно осуществить санитарно-эпидемиологические мероприятия для погашения очага инфекционного заболевания.

Цель работы — сравнить эффективность наиболее распространенных и доступных методов диагностики лептоспироза: РМА и темнопольной микроскопии.

Материалом проведенных исследований послужили кровь и моча, полученные от сухостойных коров 4-7 летнего возраста,

содержащихся на базе ЗАО СП «Аксиньино» Ступинского района Московской области. Всего было исследовано 42 пробы методом РМА и 10 — методом темнопольной микроскопии.

Мочу, полученную от животных во время естественного акта мочеиспускания, исследовали в нативном виде темнопольной микроскопией. Из 10 забранных проб в каждой были идентифицированы лептоспиры, что говорит о наличии инфекции в организме животного.

При первом исследовании методом РМА было выявлено 29 проб, а при втором — 17 проб сывороток крови (40,48%), имеющих специфические антитела в титре 1:100...1:2500 против лептоспир серогруппы *Grippotyphosa*. Следует отметить, что в различных пробах титр антител мог оставаться на прежнем уровне, понижаться, либо же антитела выявлялись только при повторном исследовании. Из общего количества исследованных проб с лептоспирами 33,34 % реагировали в титре 1:100 и выше.

Таким образом, было проведено сравнение эффективности наиболее распространенных и доступных методов диагностики лептоспироза: РМА и темнопольной микроскопии. Достоинства каждого из методов выражаются в экономической выгоде и скорости проведения диагностики. К недостаткам темнопольной микроскопии следует отнести возможность определения наличия лептоспир только с 21 дня после заражения, что обусловлено изменением локализации возбудителя на различных стадиях заболевания. При проведении реакции макроагглютинации определение лептоспир в сыворотке крови представляется возможным на первой неделе заболевания, что позволяет использовать данный метод для ранней диагностики лептоспироза. Также в качестве подтверждающих методов возможно использование ИФА или ПЦР.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

СООБЩЕСТВА БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЛИЧИНОК ПЛАСТИНЧАТОУСЫХ ЖУКОВ

Микробные сообщества кишечного тракта разнообразных насекомых оказывают своим хозяевам множество полезных услуг, такие как участие в конверсии субстрата, защита от паразитов и патогенов, модуляция иммунных реакций. В свою очередь, физиология насекомых рассматривается как фактор, в значительной степени влияющий на структуру ассоциированных с ними микробных сообществ.

За последнее десятилетие глубокое исследование микробиома разнообразных насекомых, в том числе и отряда Жесткокрылые с использованием методов высокопроизводительного секвенирования позволили расширить знания о микробиоме насекомых, а также подчеркнуть потенциальные приложения научных результатов в различных отраслях биотехнологии.

Известно несколько семейств отряда Жесткокрылые, представители которых очень тесно взаимодействуют с микроорганизмами, среди которых особо выделяется семейство Пластинчатоусые. Одни представители семейства влияют на хозяйственную деятельность человека, являясь вредителями плодовых и сельскохозяйственных культур, в то время как другие являются важными природными санитарами, питаются экскрементами и отвечая за почвообразование.

Роль многих кишечных микроорганизмов у пластинчатоусых жуков, в том числе и на личиночной стадии жизненного цикла, еще неясна и ожидает дальнейших исследований. На основе секвенирования гена *16S rPHK*, было исследовано биологическое

разнообразие микробиоты кишечника личинок нехруща обыкновенного и жука-носорога.

На основе данных высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена бактериальной 16S рРНК определено, что сообщества бактерий, ассоциированные с пищеварительным трактом личинок жуков нехруща обыкновенного, в основном, представлено бактериями доминантного семейства *Ruminococcaceae* и другими членами класса *Clostridia*, представителями порядка *Bacteroidales* (класс *Bacteroidia*), бактериями семейства *Bacillaceae* (класс *Bacilli*), а также представителями класса *Deltaproteobacteria*. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена бактериальной 16S рРНК также позволил выявить доминирование семейства *Ruminococcaceae* внутри кишечной микробиоты личинок жука-носорога, и выявить бактерии порядков *Clostridiales*, *Bacteroidales* и *Desulfovibrionales* как важных представителей бактериальных ассоциаций кишечника личинок. Интересно, что представили семейств *Ruminococcaceae* и *Bacillaceae* зарекомендовали себя как активные гидролитические бактерии.

Относительно структуры сообществ архей, ассоциированных с кишечником исследуемых в работе личинок, метаногенные археи, принадлежащие к гидрогенотрофному роду *Methanobrevibacter*, были отмечены мажорной группой в кишечнике личинок жука-носорога, в то время как в кишечнике личинок нехруща обыкновенного были отмечены археи *Candidatus Nitrososphaera* и *Methanobrevibacter* на низком уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» в рамках научного проекта № 16-34-00547.

УДК 579.236:579.25

Е. А. Ковтунов¹, В. Ю. Горшков^{1,2}, Н. Е. Гоголева^{1,2},

О. Е. Петрова¹, А. Г. Даминова¹, Ю. В. Гоголев^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

²Казанский федеральный университет

kovtunovea@mail.ru

СОЦИАЛЬНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК ФИТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *PECTOBACTERIUM* *ATROSEPTICUM*

Бактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) вызывают мягкие гнили картофеля и других сельскохозяйственных культур главным образом за счет секреции ферментов разрушающих клеточные стенки растений. К числу важных факторов вирулентности патогенных бактерий относят также подвижность, поскольку предпосылкой для развития любой инфекции является встреча патогенных бактерий с макроорганизмом. Системная колонизация хозяина пектобактериями связанная с нисходящей миграцией по сосудам ксилемы и колонизацией ризосферы, предполагает интенсивное передвижение микроорганизмов по растению, которое потенциально может осуществляться за счет разных типов подвижности.

Одним из способов колонизации поверхностей является роение бактерий, то есть зависящая от работы жгутиков, сигнальных и контактных межклеточных взаимодействий, продукции сурфактантов социальная подвижность бактерий, реализуемая в лабораторных условиях на полужидких и вязких средах. Швармеры представляют собой специфический тип бактериальных клеток, реализующих роение. Дифференциация вегетативных клеток в швармеры может быть связана с изменениями морфофизиологических параметров.

Нами определены генетические локусы, мутагенез которых приводит к определенным изменениям в фенотипе бактерий.

Выявлены характерные особенности роящихся клеток *Pba*. Показано, что швармеры *Pba* характеризуются отличной морфологией и увеличением производства факторов вирулентности по сравнению с недифференцированными вегетативными клетками. Кроме того, при дифференцировании в швармеры клетки *Pba* приобретают устойчивость к различным стрессовым факторам.

Исследование поддержано грантом РФФИ 15-14-10022.

УДК 550.72

А. В. Козлов

Нижегородский государственный педагогический университет

имени Козьмы Минина

a_v_kozlov@mail.ru

АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ПРИРОДНЫХ ВЫСОКОКРЕМНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ САПРОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ ДЕРНОВО- ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ

Наряду с ферментами протеолитического действия многие сапротрофы выделяют во внешнюю среду энзимы оксидоредуктазного типа, биохимическое действие которых направлено на осуществление редокс-процессов, приводящих к трансформации сложных органических веществ. К таковым относят также ферментные системы, продуцируемые большинством почвенных прокариот, относящихся к олиготрофной и автохтонной экологическим нишам. В почвах метаболизм данных бактерий направлен, главным образом, на осуществление процессов трансформации гумусовых компонентов, а также предгумусовых матриц органической части почвы. В практике современного почвоведения недостаточно сведений, описывающих поведение сапротрофных почвообитающих микроорганизмов дерново-подзолистых почв в условиях длительного взаимодействия с веществом

минеральных удобрений и, в особенности, с такими нетрадиционными почвенными кондиционерами как природные кремнийсодержащие породы.

В рамках настоящих исследований целью явилось изучение динамики некоторых свойств культивируемой микробной суспензии олиготрофных и автохтонных бактерий, выделенных из дерново-подзолистых легкосуглинистых почв Нижегородской области, в условиях их взаимодействия с веществом диатомита Инзенского, цеолита Хотынецкого и бентонитовой глины Зырянского месторождения.

Микробиологические эксперименты проведены в 2017 году на базе лабораторных комплексов Мининского университета, которые были поставлены по классическим биотехнологическим и биохимическим прописям.

В целом по опытам нужно сказать, что за 30 дней культивирования олиготрофов на жидком варианте «голодного» агара (разбавление исходной среды в 20 раз), каталазная активность бактериальной суспензии, определяемая по методике Джонсона и Темпле, оставалась практически неизменной (на уровне $0,12 \pm 0,01$ мл $0,01$ Н раствора $\text{KMnO}_4/1$ мл) в случае деградации олиготрофами бентонита и имела стабильную тенденцию к повышению (до $1,06 \pm 0,03$ мл $0,01$ Н раствора $\text{KMnO}_4/1$ мл на 30-ый день) в случае минерализации диатомовой породы. У автохтонных бактерий, выращиваемых на жидком варианте нитритного агара Теппер, активность каталазы оставалась на уровне $0,13 \pm 0,01$ мл $0,01$ Н раствора $\text{KMnO}_4/1$ мл в течение всего периода биохимического взаимодействия с кремниевыми материалами.

В отличие от пероксидазной ферментативной активности бактериальных суспензий, которая также практически не менялась в течение всего срока экспозиции опыта, полифенолоксидазная активность (обе активности определены по методике К. А. Козлова) стабильно возрастала к концу эксперимента, причем в большей степени на варианте с диатомитом (до $0,92 \pm 0,01$ мл $0,01$ Н раствора $\text{I}_2/1$ мл) и с бентонитовой глиной (до $1,04 \pm 0,02$ мл $0,01$ Н раствора $\text{I}_2/1$ мл).

А. В. Козлов

Нижегородский государственный педагогический университет

имени Козьмы Минина

a_v_kozlov@mail.ru

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ-АМИНОГЕТЕРОТРОФОВ И СТЕПЕНИ МИНЕРАЛИЗАЦИИ СИСТЕМЫ «ПОРОДА-КУЛЬТУРА» В УСЛОВИЯХ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ДИАТОМИТА, ЦЕОЛИТА И БЕНТОНитОВОЙ ГЛИНЫ

В прикладных исследованиях современного почвоведения известны факты положительного действия природных высококремнистых материалов, вносимых в почву в качестве удобрительных веществ. Однако процессы их взаимодействия с веществом почвы в настоящее время изучены недостаточно, равно так же, как и процессы биохимического превращения, осуществляемые под действием наиболее стабильных микробных консорциев почв, входящих в зимогенную экологическую нишу – аминокетотрофов.

В рамках настоящих исследований целью явилось изучение динамики численности аммонифицирующих бактерий, культивируемых на пептонной воде, а также степени общей минерализации (бактериального выщелачивания) вещества природных кремнийсодержащих пород – диатомита, цеолита и бентонитовой глины.

Численность живых клеток определяли в 30-дневной динамике культивирования аммонификаторов с веществом пород с помощью люминесцентной микроскопии с акридином оранжевым на микроскопе «БиоТех-330-LED2-Тг». Определение общей минерализации бактериальной суспензии проводили кондуктометрическим методом с помощью кондуктометра DIST-3 HANNA. Исследования проведены в 2017 году на базе лабораторных комплексов Мининского университета.

Было установлено, что наибольшая численность бактерий-аминокетотрофов пришлась на 10 день культивирования суспензий, которая на варианте с диатомитом составила $4,752 \times 10^9$ клеток/1 мл. На

варианте с бентонитовой глиной она оказалась на среднем уровне – $3,204 \times 10^9$ клеток/1 мл, а на варианте с цеолитом – на минимальном ($3,020 \times 10^9$ клеток/1 мл).

При дальнейшем культивировании количество живых клеток в системе «порода-культура» плавно спадало и на 30 день составило $4,031 \times 10^6$, $12,263 \times 10^6$ и $88,509 \times 10^6$ клеток/1 мл соответственно на варианте с диатомитом, цеолитом и бентонитовой глиной.

Показатель общей минерализации, характеризующий степень бактериального выщелачивания вещества пород, менялся как в зависимости от вида материала, так и от времени анализа.

Например, деятельность аммонифицирующих бактерий была наиболее активна в отношении диатомита – высвобождение в растворимое состояние солей химических элементов достигало 510 мг/мл. Наименьшая биохимическая активность прослеживалась по отношению к цеолиту, где максимальное содержание растворимых форм химических элементов в культуре не превышало и 403 мг/мл.

Также нужно отметить, что пики наибольших концентраций солей в бактериальных суспензиях приходились на 10–20 дни культивирования в зависимости от породы и самой бактериальной культуры.

УДК 579.262

А. В. Коротаев, К. А. Бенкен, Е. В. Сабанеева

Санкт-Петербургский государственный университет

alvlkorotaev@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ СИМБИОЗОВ ИНFUZОРИЙ РОДА *PARAMECIUM* С БАКТЕРИЯМИ

Образование симбиотических консорциумов между бактериями и инфузориями не является редким событием. Более того, они могут различаться как специфичностью, так и длительностью взаимоотношений. Подобные системы представляют собой удобные модели для изучения молекулярных основ взаимного узнавания и

взаимодействия хозяев и их эндосимбионтов. Тем не менее, степень изученности симбиозов инфузорий остается на достаточно низком уровне.

В солоноватоводных заплесках на побережье Белого моря в районе губы Чупа, нами была собрана популяция инфузорий рода *Paramecium*, содержащая множественных бактериальных эндосимбионтов. Для описания симбиотических систем мы использовали микроскопические (световая, атомно-силовая, конфокальная лазерная сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия), молекулярные (флуоресцентная гибридизация *in situ* с олигонуклеотидными зондами, специфичными к фрагментам последовательности 16S рРНК) и цитохимические методы исследования. Видовой состав популяции (*P. nephridiatum* и *P. calkinsi*) был предварительно определен по морфологическим признакам. Всего мы обнаружили пять различных эндосимбиотических бактерий. Подробнее были изучены два эндосимбионта: подвижные бактерии веретеновидной формы с характерной светопреломляющей структурой в центре клетки, найденные в цитоплазме *P. nephridiatum*, и неподвижные бактерии извитой формы, обнаруженные в цитоплазме *P. calkinsi*. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с группоспецифичными олигонуклеотидными зондами показала, что данные симбионты принадлежат к группе Alpha-proteobacteria. Дальнейшее изучение эндосимбионтов с помощью гибридизации *in situ* с олигонуклеотидными зондами позволило установить, что эндосимбионты *P. calkinsi* распознаются зондом, специфичным к роду внутриядерных эндосимбионтов парамеций *Holospora*, однако по своей ультраструктуре существенно отличаются от морфологии инфекционных форм холоспор. Эндосимбионт *P. nephridiatum* распознается зондами, специфичными к семейству “*Candidatus Midichloriaceae*” и к роду *Lyticum*. Трансмиссионная электронная микроскопия выявила наличие светопреломляющих тел и жгутиков у эндосимбионта *P. nephridiatum*. Интересно, что морфологически этот

эндосимбионт крайне похож на описанных ранее представителей рода *Pseudolyticum*, для которых молекулярные данные отсутствуют. Полученные данные позволяют предположить, что представители родов *Pseudolyticum* и *Lyticum* относятся, вероятно, к одному роду и указанные таксоны могут быть объединены в один род. Помимо прочего с помощью цитохимических методов мы попытались выяснить происхождение включений эндосимбионтов *P. nephridiatum*. Окрашивание с помощью ДАРІ в высоких концентрациях выявило, что светопреломляющие тела не являются полифосфатами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-06410) с использованием оборудования Ресурсного Центра микроскопии и микроанализа и Ресурсного Центра развития молекулярных и клеточных технологий.

Научный руководитель – Е. В. Сабанеева, канд. биол. наук, доцент кафедры цитологии и гистологии СПбГУ.

УДК 579.253.42

Е.А. Куприянова, С.Ю. Маланин, Д.Д. Сафина, С.Р. Абдулхаков

Казанский федеральный университет

fewrandomletters@gmail.com

ВЫЯВЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ, ПРИМЕНЯЕМЫМ В ЭРАДИКАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ

Бактерия *Helicobacter pylori* может являться причиной хронического гастрита, язв желудка и двенадцатиперстной кишки и других заболеваний желудочно-кишечного тракта. Основой эрадикации *H. pylori* остается антибиотикотерапия, включающая такие препараты как кларитромицин, амоксициллин, метронидазол и фторхинолоны. Однако все чаще эффективность такого лечения находится под угрозой из-за растущей устойчивости бактерии к используемым лекарственным средствам. Микробиологические

методы выявления резистентности на питательных средах с добавлением одного из антибактериальных препаратов отличаются длительностью и трудоемкостью. В связи с этим большое значение имеет развитие методов молекулярной диагностики анитибиотикорезистентности, позволяющих получить быстрый и достоверный результат.

Таким образом, целью данной работы являлась разработка универсального молекулярно-генетического метода выявления устойчивости *H. pylori* к антибактериальным препаратам в биопсийном материале желудка.

Образцы биопсии желудка были получены от 62 пациентов, прошедших процедуру гастроскопии в Республиканской клинической больнице г. Казани. Биологический материал гомогенизировали с помощью прибора FastPrep24 (MP Biomedicals), затем проводили выделение ДНК с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) по протоколу выделения нуклеиновых кислот из тканей. С полученной ДНК проводилась ПЦР со специфическими праймерами к участкам генов, точечные мутации в которых являются причиной формирования резистентности к кларитромицину, амоксициллину, фторхинолонам и метронидазолу. Для обнаружения нуклеотидных замен ПЦР-продукты секвенировались на приборе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

В результате проведения ПЦР было показано наличие *H. pylori* в 26 биоптатах. Устойчивость хеликобактера к кларитромицину вырабатывается в результате мутаций в гене 23S рРНК. Анализ данных секвенирования данного гена показал наличие ключевых замен (A2143C и A2144G), характерных для резистентных штаммов, в восьми образцах, а также пять случаев замен T2183C, ассоциированных с низким уровнем резистентности. Устойчивость к фторхинолонам обусловлена мутациями в гене *gyrA* ДНК-гиразы А, наиболее значимыми из которых являются аминокислотные замены Asn-87-Lys и Asp-91-Asn. Среди 26 человек лишь у трех

обнаружились искомые мутации. Причиной невосприимчивости *H. pylori* к амоксициллину могут быть множественные мутации в гене пенициллин-связывающего белка *pbp1*. В нашем случае 13 образцов из 26 исследованных показали наличие замен, связанных с низким уровнем резистентности к данному антибиотику. Наконец, при исследовании устойчивости к метронидазолу, которая вызывается нонсенс-мутациями в гене *rdxA* NADPH-нитроредуктазы, не было выявлено ни одного случая замен в данном гене.

Таким образом, использованный нами метод позволяет быстро определить в биопсийном материале желудка устойчивые к различным группам антибиотиков формы *H. pylori*.

Научный руководитель – С.Ю. Маланин, канд. биол. наук.

УДК 579.835:62(577.152.1)

М. А. Купряшина, Е. Г. Пономарева, В. Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов

РАН, г. Саратов

kupryashina_m@mail.ru

ПРОТЕКТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА АЗОСПИРИЛЛ

Дiazотрофные бактерии рода *Azospirillum* способны поддерживать физиологически активное состояние в зоне ризосферы, ризоплане, также во внутренних частях корня растения-хозяина. Известно, что в процессе выживания ризобактерий в данных условиях одним из лимитирующих факторов выступают фенольные соединения, так как при становлении симбиотических отношений происходит активация защитного механизма макрохозяина, аналогичного сверхчувствительной реакции «растение–патоген», при этом ароматические соединения играют роль главных токсикантов. Наряду с синтезом экстраклеточных и капсульных полисахаридов для преодоления защитного барьера растительных полифенолов

азоспириллам необходима способность к синтезу специфических ферментов, участвующих в детоксикации фенольных соединений.

Лакказы, тирозиназы, лигнин-пероксидазы и Mn-пероксидазы – внеклеточные неспецифические окислительные ферменты, уникальные кинетические характеристики которых позволяют им участвовать в процессах деградации многих полициклических соединений. В ходе ряда исследований нам удалось установить, что наряду с тем, что лигнин- и Mn-пероксидазы опосредуют проникающую способность бактерий, благодаря лигнинолитической функции, данные ферменты являются протекторами при становлении симбиотических отношений, за счет разрушения токсичных вторичных метаболитов растения-хозяина. Защитная роль фенолоксидаз полифункциональна. На гомогенных препаратах ферментов было показано, что именно лакказы и Mn-пероксидазы участвуют в биоредукции токсичных соединений металлов с образованием наночастиц, что отражается в способности азоспирилл к биосинтезу наночастиц золота и серебра. Также нами отмечена положительная корреляция фенолоксидазной активности азоспирилл со способностью к биодеградации токсичных синтетических красителей.

Установлено, что различные генетические события, коррелирующие с проявлением фенотипической неоднородности популяций азоспирилл и затрагивающие способность к движению, социальное поведение, а именно образование биопленок и колонизацию растений, также отражаются и на уровне фенолоксидазной активности бактерий. Можно предположить, что стратегии выживания и взаимодействия с растением хозяином азоспирилл, как диких штаммов, так и их вариантов с различными фенотипическими изменениями, тем или иным образом связаны с действием фенолоксиляющих ферментов, благодаря свойствам которых реализуются механизмы резистентности, будь то преодоление фенольного барьера почвы, токсического действия вторичных метаболитов растения-хозяина или лимитирующего действия биотических и абиотических факторов.

УДК 579.64

М. Т. Лутфуллин¹, С.Г. Вологин², З. Сташевски²,

А. В. Малова¹, Н. К. Мочалова¹, Г. Ф. Хадиева¹

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Татарский НИИ сельского хозяйства, г. Казань*

lutfullin.marat2012@yandex.ru

ВОЗБУДИТЕЛИ ЛАТЕНТНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ КАРТОФЕЛЯ

В настоящее время опасной болезнью является фузариоз, который вызывается разными видами микромицетов рода *Fusarium*. При благоприятных для возбудителя условиях растения погибают в течение нескольких дней и потери урожая могут достигать 15-20%. Дестабилизация фитосанитарной обстановки в Республике Татарстан способствует увеличению пораженности семенного материала картофеля фитопатогенными микромицетами, что в свою очередь приводит к повышению доз вносимых удобрений и пестицидов, негативно влияющих на экологию и здоровье человека. В случае сильного травмирования клубней, например при комбайновой уборке наблюдаются большие потери от гниения в период хранения. Фузариозная инфекция сохраняется в клубнях в скрытом (латентном) состоянии. Применение инфицированного посадочного материала приводит к изреживанию всходов и торможению роста растений.

Настоящая работа посвящена выявлению латентной инфекции в образцах клубней картофеля сорта Жуковский. В ходе работы были выделены и идентифицированы фитопатогенные микромицеты – возбудители латентной инфекции. Латентное инфицирование клубней картофеля микромицетами оценивалось по следующему методу. Предварительно помыли клубни картофеля. Область, прилегающую к столонному концу клубня, очистили от кожуры. Отрезали диск шириной 3-4 мм и удаляли его. Отрезали 3 диска толщиной приблизительно 2-3 мм. Поместили диски в раствор 96%

этанолом на 2 минуты, при этом диски не должны соприкасаться друг с другом. Затем промывали диски в дистиллированной воде. Далее высушивали диски стерильной фильтровальной бумагой и переносили в стерильные чашки Петри с двухслойной увлажнённой стерильной фильтровальной бумагой. Инкубировали в течение 7 суток при комнатной температуре, сохраняя фильтровальную бумагу влажной. Молекулярно-генетическую идентификацию выделенных микромицетов проводили по анализу нуклеотидных последовательностей ITS-области генов 5,8S рДНК с использованием праймеров ITS1F и ITS4R. Секвенирование проводилось в Научно-производственной компании СИНТОЛ (г. Москва).

Из клубней картофеля сорта Жуковский были выделены 11 изолятов микромицетов. При повторном инфицировании здоровых клубней картофеля было выявлено 5 фитопатогенных микромицетов, вызывающих сухую гниль клубней картофеля в разной степени. Молекулярно-генетическая идентификация позволила установить видовую принадлежность 3-х фитопатогенных изолятов: *Fusarium oxysporum* FGM 9 (идентичность 99%), *Fusarium oxysporum* FGM 10 (99%), *Fusarium solani* FGM 11 (98%), родовую принадлежность 2-х фитопатогенных изолятов: *Fusarium sp.* FGM 13 (96%), *Fusarium sp.* FGM 14 (96%).

Таким образом, было установлено, что основными возбудителями латентного инфицирования картофеля сорта Жуковский являются микромицеты рода *Fusarium*. Наиболее распространёнными и вирулентными для картофеля являются микромицеты – *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 17-44-160481.

Научный руководитель – А.М. Марданова, канд.биол.наук., доцент.

УДК 579.61

А. П. Любина, М. Н. Агафонова, Н. В. Штырлин,

С. В. Сапожников, Ю. Г. Штырлин

Научно-образовательный центр фармацевтики,

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

aplyubina@gmail.com

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ НА КЛЕТКИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Антимикробные средства являются неотъемлемыми компонентами не только поддержания личной гигиены, но и контроля над возникновением и распространением различных инфекционных заболеваний. Четвертичные аммониевые соли на сегодняшний день являются одним из перспективных классов дезинфицирующих средств, однако их применение ограничивается способностью микроорганизмов вырабатывать устойчивость к данным соединениям. Модификация ЧАС заместителями различной природы является возможным путем решения данной проблемы.

В данной работе был исследован новый потенциальный антибактериальный препарат АМ17 на основе четвертичных аммониевых солей, синтезированный в отделе медицинской химии Научно-образовательного центра фармацевтики КФУ.

На первом этапе методом серийных разведений были определены минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации исследуемого соединения для каждого тест-штамма микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 209P и *Escherichia coli* CDC F-50. Исследуемое соединение АМ17 показало антимикробную активность значительно выше, чем у широко применяемых препаратов того же класса в отношении как грамположительных

(*Staphylococcus aureus* 209P), так и грамотрицательных (*Escherichia coli* CDC F-50) бактерий.

Далее была изучена способность исследуемого соединения AM17 изменять электрический потенциал мембраны при помощи потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiOC2(3). При исследовании влияния AM17 на мембрану бактерий была показана его способность вызывать деполяризацию цитоплазматической мембраны бактерий независимо от фазы роста микроорганизма.

На следующем этапе было изучено влияние исследуемого соединения на уровне изменения протеомного профиля *Escherichia coli* CDC F-50 после краткосрочной инкубации с AM17. Согласно данным, полученным при анализе белков-отличий, изменения затрагивают преимущественно внутреннюю мембрану бактерий, также следует отметить изменения при взаимодействии с внутриклеточными мишенями бактерий и нарушение работы рибосом.

Таким образом, в ходе работы было исследовано воздействие соединения AM17 на штаммы *Escherichia coli* CDC F-50 и *Staphylococcus aureus* 209P, показано эффективное бактериостатическое и бактерицидное действие AM17 на тест-микроорганизмы, продемонстрировано повреждающее действие AM17 на мембрану бактерий. Кроме того, выявлены значительные изменения протеомного профиля *Escherichia coli* в результате краткосрочной инкубации с AM17. Полученные данные позволяют говорить о возможности успешного использования данного вещества в качестве антимикробного средства.

Научный руководитель – М. Н. Агафонова, канд. хим. наук.

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

А.З. Миндубаев¹, И.Ф. Сахапов¹, Ш.З. Валидов²,
Э.В. Бабынин², Д.Г. Яхваров¹

¹ *Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
КазНЦ РАН.*

² *Казанский (Приволжский) федеральный университет.
mindubaev@iopc.ru; mindubaev-az@yandex.ru*

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ БЕЛОГО ФОСФОРА ДЛЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, И ЕГО ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ

Белый фосфор Р₄ является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Но продукт его окисления фосфат необходим всем живым организмам. Целью настоящего исследования являлась переработка белого фосфора при помощи микроорганизмов. Использовали смесь уплотненного и обезвоженного осадка сточных вод (ОСВ) МУП Водоканал г. Казани. Белый фосфор вносился в ОСВ нами в виде водной эмульсии. При содержании Р₄ в субстрате 0.1% по массе, наблюдалось значительное угнетение жизнедеятельности микрофлоры. Тем не менее, даже при такой концентрации токсичного вещества не наблюдалась полная гибель микроорганизмов. При содержании Р₄ в иле 0.01% по массе, наблюдалось значительное угнетение в течение приблизительно 2–3 недель, затем жизнедеятельность вновь восстанавливалась.

Нами впервые произведены посеvy микроорганизмов в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорное голодание. Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора. Самая высокая концентрация соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз, а в водах хозяйственно-бытового назначения – в сто миллионов раз!

Для генетической идентификации гриба, метаболизирующего белый фосфор и отнесенного к виду *Aspergillus niger*, была определена

нуклеотидная последовательность его регионов ITS1 и ITS2. Сравнение полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank с помощью системы BLAST, позволяет идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм *A. niger*. Ему мы присвоили номер *A. niger* AM1. Нуклеотидная последовательность штамма опубликована в базе данных GenBank, где ей присвоен номер KT805426.

Посев *A. niger* AM1 в среду, содержащую сразу два источника фосфора (фосфат и белый фосфор) продемонстрировал, что P₄ не проявляет токсические свойства по отношению к этому микроорганизму. В присутствии белого фосфора он растет с такой же скоростью, как в его отсутствии. Это единственный пример отсутствия токсичности белого фосфора для живого организма.

Проведена оценка генотоксичности белого фосфора при помощи SOS-lux теста, которая продемонстрировала ее наличие. Этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у белого фосфора. Белый фосфор проявляет слабую мутагенную активность.

Научный руководитель – Д.Г. Яхваров, д-р хим. наук, доцент

УДК 579.222.3

П. С. Мишеева, З. С. Тошева, Л.Ф. Миннуллина

Казанский федеральный университет

p.misheeva@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СИНТЕЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ И ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗ *SERRATIA GRIMESII*

Serratia grimesii является условно-патогенной бактерией семейства *Enterobacteriaceae*. Ранее в клетках *S. grimesii* была описана новая металлопротеиназа гримелизин, специфически расщепляющая скелетно-мышечный актин с образованием стабильного 36 кДа фрагмента. Обнаружена корреляция между активностью гримелизина

и инвазивной активностью бактерий. Данные по внеклеточным протеиназам *S. grimesii* в настоящее время отсутствуют.

Целью работы являлось изучение влияния температуры культивирования на рост бактерий и уровень внутриклеточной и внеклеточной протеазной активности у бактерий *S. grimesii* A2. Бактерии культивировали на среде LB при 30 и 37°C. Исследовали рост, подвижность и протеазную активность бактерий *S. grimesii* при разных температурах. Протеазную активность исследовали по гидролизу азоказеина и скелетно-мышечного актина. Для получения лизата клетки разрушали с помощью замораживания-оттаивания и затем центрифугировали при 15000 об/мин в течение 30 мин. Гидролиз актина исследовали с помощью электрофореза в 12% ПААГ-SDS по Лаемли.

Результаты. Показали, что динамика роста бактерий *S. grimesii* различается при разных температурах. Оптимальной температурой роста является 30°C. Максимальная оптическая плотность культуры при 30 °C составляет 2.4 опт. ед, а при 37 °C – 2.0 опт. ед. Подвижность *S. grimesii* на питательной среде LB, содержащей 0.33 % агара, при 30°C выше, чем при 37 °C: диаметр колоний на 25 час достигал 69 и 24 мм соответственно.

Исследовали протеолитическую активность в культуральной жидкости по гидролизу азоказеина на разных стадиях роста: на экспоненциальной фазе (12 час) и стационарной стадии роста (24 и 48 час). Показали, что внеклеточная активность появляется на 12 час роста и достигает максимальных значений на 24 и 48 час роста. Оптимальной температурой для накопления внеклеточной протеиназы является 30 °C. Так на 24 и 48 час активность достигала 0.55 и 0.59 ед соответственно. При 37°C максимальная активность наблюдалась на 24 час роста и составляла всего 0.18 ед. Также установлено, что уровень внутриклеточной протеазной активности зависит от температуры культивирования. При использовании в качестве субстрата азоказеина показали, что при 30°C

протеолитическая активность в клетках появляется на 48 час роста и достигает 0.05 ед. В тоже время при 37°C максимальная активность по гидролизу азоказеина наблюдалась в 24 часовых клетках и составляла 0.184 ед. При использовании в качестве субстрата скелетно-мышечного актина обнаружили такую же закономерность. При 30°C в клеточных экстрактах 48 часовых бактерий обнаружена протеиназа, ограниченно расщепляющая актин, что характерно для гримелизина. При 37°C ограниченный протеолиз актина наблюдали уже в лизатах 24 часовой культуры.

Таким образом, накопление внеклеточной и внутриклеточной протеазной активности *S. grimesii* по-разному зависит от температуры культивирования. Оптимальной для накопления внеклеточной активности является 30°C, а для внутриклеточной активности - 37 °C.

Научный руководитель – А. М. Марданова, канд. биол. наук, доцент.

УДК 577.15:579.252

Ч. Б. Нуриахметова¹, Е. А. Ковтунов², А. Г. Даминова²,
Ю. В. Гоголев^{1,2}, В. Ю. Горшков^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет

² Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ch_nuriakhmetova@mail.ru

ГЛИКОЗИЛ-ГИДРОЛАЗЫ *PESTOBACTERIUM ATROSEPTICUM*: ВКЛАД В ВИРУЛЕНТНОСТЬ

Пектобактерии относятся к одним из самых вредоносных фитопатогенов, вызывающих у растений картофеля заболевание «черная ножка» в полевых условиях и мягкую гниль клубней картофеля при хранении. При взаимодействии с растением-хозяином пектобактерии используют «грубую силу», продуцируя комплекс ферментов, разрушающих различные компоненты растительной клеточной стенки.

В результате проведенного транскриптомного анализа нами определено, что у *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*), находящихся в растении, активируется экспрессия генов, кодирующих факторы вирулентности, в том числе ферменты, разрушающие полисахариды растительной клеточной стенки. Для выяснения возможной роли некоторых из этих ферментов во взаимодействии пектобактерий с растениями, нами были получены и проанализированы штаммы *Pba*, мутантные по генам, аннотированным как рамногалактуронил гидролаза (ЕСА3749) и β -1,4-эндогалактаназа (ЕСА0852).

Ферменты, кодируемые данными генами, могут катализировать модификацию рамногалактуронана I – одного из пектиновых веществ растительной клеточной стенки. Нами было показано, что этот полимер (и/или высокомолекулярные продукты его распада) необходим для формирования бактериальных эмболов – «многоклеточных» структур, формируемых *Pba* в сосудах ксилемы. В связи с этим, важную информацию о формировании системы паразит/хозяин могут предоставить данные о роли ферментов *Pba*, модифицирующих этот полимер и потенциально изменяющих его физико-химические свойства.

Анализ на вирулентность проводили, используя заражение клубней картофеля пектобактериями с последующим взвешиванием мацерированных тканей. Инактивация ЕСА3749 и ЕСА0852 приводила к снижению патогенных свойств бактерий. Вес мацерированной ткани был достоверно меньше в клубнях, инокулированных мутантными формами. Таким образом, как рамногалактуронил гидролаза, так и β -1,4-эндогалактаназа вносят вклад в процесс развития «мокрой гнили» клубней картофеля.

Исследование поддержано грантом РФФИ №15-14-10022.

Научный руководитель – В. Ю. Горшков, канд. биол. наук.

УДК 579.61

А. С. Павлова, И. С. Шарафутдинов, А. Р. Курбангалиева,
А. Р. Каюмов

Казанский федеральный университет

AnBio96@yandex.ru

СПЕЦИФИЧНОЕ АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО 2(5H)-ФУРАНОНА НА *BACILLUS CEREUS*

Инфекции, вызванные грамположительными бактериями, остаются серьезной проблемой в сфере здравоохранения. Приобретение бактериями устойчивости к антибиотикам приводит к необходимости поиска новых антимикробных препаратов. *Bacillus cereus* – широко известный микроорганизм, встречающийся во всех эконишах. Он может вызывать как пищевые отравления, так и раневые инфекции, бактериемию, септицемию или пневмонию. Устойчивость *B. cereus* обычно обусловлена их способностью производить бета-лактамазы, однако некоторые штаммы могут также проявлять устойчивость к хлорамфениколу или тетрациклину. Способность *B. cereus* образовывать прочные биопленки как на естественных, так и на искусственных поверхностях значительно повышает устойчивость *B. cereus* к различным внешним факторам. Использование антибиотиков с агентами, ингибирующими образование бактериальных биопленок предстает многообещающей стратегией, и в этом свете фураноны являются весьма интересными кандидатами. В этой работе мы провели анализ производного 2(5H)-фуранона (Ф123), который эффективно ингибирует рост и образование биопленки *B. cereus*.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) исследуемого фуранона оказалась равной 8 мкг/мл для *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* и *B. cereus*, тогда как для *B. subtilis* МПК был равен 16 мкг/мл. Все изучаемые грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* оказались

невосприимчивыми к соединению. Интересно отметить, что минимальная бактерицидная концентрация (МБК) для фуранона была обнаружена только на бактериях *B. cereus* и была равна значению ее МПК. Минимальные подавляющие концентрации биопленки (МБПК) были определены путем окрашивания кристаллическим фиолетовым остаточных биопленок. Для *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* и *B. subtilis* МБПК соответствовали их значениям МПК. Значительная способность Ф123 влиять на клетки в составе зрелой биопленки была обнаружена только на *B. cereus*. Ф123 уменьшил количество КОЕ *B. cereus* находящихся в биопленке на 2 порядка в концентрации 64 мкг/мл, тогда как для *B. subtilis* концентрация Ф123 была выше, сохранив тенденцию специфического воздействия на клетки *B. cereus*.

Мы сравнили кинетические кривые гибели клеток грамположительных бактерий *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *B. cereus* и грамотрицательной бактерии *E. coli* в качестве контроля. Ф123 показал бактериостатические свойства при концентрации $4 \times$ МПК против *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* и *B. subtilis*. Уникальным является то, что Ф123 проявил избирательное действие по отношению к клеткам *B. cereus*, убив все бактерии в течение 8 часов. Будучи таким бактерицидным соединением, избирательно действующим только на *B. cereus*, Ф123 мог бы найти свое применение в соответствующих областях, где необходимо предотвращать или уничтожать специфичные для *B. cereus* загрязнения, например, в пищевой промышленности или в глазных инфекциях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-14-00046.

Научный руководитель – канд. биол. наук, доцент А. Р. Каюмов.

УДК 579.68

Е.С. Протасов¹, Д.В. Аксенов-Грибанов^{1,2}, И.В. Войцеховская^{1,2}, Я.А. Ржечицкий¹, М.А. Тимофеев^{1,2}.

¹Научно-исследовательский институт биологии, Иркутск

²Байкальский исследовательский центр, Иркутск

protasov.evgenii@gmail.com

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ ПОЛИКЕТИДСИНТАЗ У АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГРУНТОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Поликетидсинтазы являются мультимодульными ферментами, ответственными за синтез вторичных метаболитов, в т.ч. эритромицин, доксорубин, авермектин и др. Многие из данных препаратов были впервые получены из актинобактерий, а позже с применением современных технологий и подходов биотехнологии и генетической инженерии модифицированы. Данная группа бактерий является основным источником используемых в современной медицине антибиотиков.

Целью работы являлось выявление генов вторичного метаболизма и оценка их разнообразия среди актинобактерий выделенных из грунтов озера Байкал.

Озеро Байкал является уникальной экосистемой, в которой уровень эндемизма среди отдельных групп организмов достигает 100%. Актинобактерии, выделенные из экосистемы озера, обладают высоким уровнем биологической активности как против бактерий, так и против грибов. Для оценки наличия генов поликетидсинтаз 1-го типа среди байкальских актинобактерий, выделенных из грунтов озера, были использованы следующие праймеры - KSMA 5'-TS GCS ATG GAC CCS CAG CAG-3' и KSMB 5'-CC SGT SCC GTG SGC CTC SAC- 3', K1 5'TSAAGTCSAACATCGG BCA3' и M6R 5'CGCAGGTTSCSGTACCAGTA3'.

Из 24 выделенных штаммов, 20 принадлежали к роду *Streptomyces* и по два штамма к родам *Micromonospora* и *Pseudonocardia*. Все исследованные штаммы показали наличие ПЦР-продукта для пары

праймеров KSMA/ KSMB. Для пары праймеров K1/M6R пять штаммов стрептомицетов не выявили наличие соответствующего фрагмента гена поликетидсинтаз. Полученные ПЦР продукты были клонированы с помощью вектора pGEM-T в компетентные клетки *E. coli*, а нуклеотидные последовательности были конвертированы в аминокислотные последовательности. Построенное на их основе филогенетическое дерево показало сродство байкальских штаммов к штаммам актинобактерий, выделенных из почв. В тоже время уровень сродства колебался от 49 до 97 %, что может говорить об уникальности поликетидсинтаз и их продуктов. Так, в рамках проведенных работ установлено, что штамм *Pseudonocardia* sp. IB2016P333-1 содержит ген фермента erythronolide синтазы, который входит в путь биосинтеза эритромицина.

Таким образом, штаммы из экстремальных по своим условиям экосистемам, являются перспективным объектом для поиска новых продуцентов биологически активных веществ.

Настоящее исследование проведено при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ (16-34-00686), гранта Минобрнауки РФ Госзадание 6.9654.2017/8.9. и гранта ИГУ для молодых ученых и аспирантов.

Научные руководители – М.А. Тимофеев, д-р биол. наук; Д.В. Аксёнов – Грибанов, канд. биол. наук.

УДК 579.222.3

А. А. Пьянкова, Д. О. Егорова, Л. Н. Ананьина

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,

г. Пермь

annpjankva@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *CHROMOHALOBACTER*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННОГО ЭКОТОПА ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

Бактерии рода *Chromohalobacter* выделены из высокоминерализованных биотопов различных эколого-географических зон мира. Для выживания в подобных условиях бактерии поддерживают

осмотический баланс, как правило, за счет синтеза *de novo* «совместимых веществ», основным из которых для бактерий рода *Chromohalobacter* является эктоин. На настоящий момент нет сведений о патогенности бактерий этой таксономической группы, они не требуют сложных питательных сред и условий культивирования и потому являются перспективными для применения в биотехнологии. Цель настоящей работы - изучение биосинтеза эктоина штаммами бактерий рода *Chromohalobacter*, выделенными из высокоминерализованного экотопа района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей.

Из образца соляной корки солеотвала БКПРУ-1 предприятия ПАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край), концентрация водорастворимых ионов натрия в котором составляла 1436.69 мг-экв/100г, на агаризованной минеральной среде Раймонда с 10% NaCl были выделены бактериальные изоляты ТС191, ТС193 и ТС195. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (длина около 1200 п.н.) выделенных штаммов с таковыми из базы данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>) установило, что исследуемые бактерии являются членами рода *Chromohalobacter* семейства Halomonadaceae. Наиболее высокий уровень 16S рДНК-сходства, составляющий 99.92 %, штаммы проявили с видом *Ch. japonicus* 43T (AB105159). Изучение геномов выделенных бактерий с помощью Рер-ПЦР показало, что изоляты ТС193 и ТС195 имели одинаковый профиль продуктов амплификации, но отличались от штамма ТС191 и, следовательно, являются представителями разных геномогрупп. Для дальнейшего исследования были отобраны штаммы ТС191 и ТС193.

Определена внутриклеточная концентрация эктоина у исследуемых бактерий, выращенных на глюкозе в минеральной среде Раймонда в присутствии 50 или 100 г/л NaCl, методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что с увеличением концентрации NaCl в среде культивирования в 2 раза внутриклеточная концентрация эктоина штаммов ТС191 и ТС193 также возрастала с 1 мкМ до 2 мкМ и с 0,8 мкМ до 1,6 мкМ, соответственно. Отмечено влияние температуры на внутриклеточный пул эктоина: увеличение температуры культивирования с 28 °С до 37 °С привело к

снижению внутриклеточной концентрации эктоина до 0,46 мкМ. Методом ПЦР на ДНК-матрице исследованных штаммов с применением праймеров комплементарных *ect*-генам галомонад получен фрагмент ожидаемой длины около 1300 п.н.

Таким образом, показано, что исследуемые штаммы бактерий рода *Chromohalobacter* являются перспективными для биотехнологии промышленного получения эктоина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и министерства образования и науки Пермского края № 17-44-590178.

Научный руководитель – Л. Н. Ананьина, канд. биол. наук.

УДК 579.222

В.А. Романова, Е.А. Булыгина, Т.В. Григорьева, А.В. Лайков

Казанский федеральный университет

avonamora-94@mail.ru

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕГО ШТАММА АКТИНОБАКТЕРИЙ *TSUKAMURELLA* *TYROSINOSOLVENS* PS2 ЧЕРЕЗ ПОЛНОГЕНОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

Процесс селекции новых штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов остается актуальным вследствие загрязнения окружающей среды нефтью. Среди них достаточно часто встречаются условно-патогенные штаммы, способные выживать как в неблагоприятной окружающей среде, так и в организме хозяина, благодаря наличию универсальных факторов устойчивости. Вопрос о безопасности применения условно-патогенных штаммов бактерий в биоремедиации загрязненных участков окружающей среды по сей день остается открытым.

Из твердых отходов предприятия химического синтеза нами был выделен бактериальный изолят, способный к росту на питательных средах с алифатическими насыщенными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии. По гену 16S рРНК

изолят идентифицирован как *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2. Нами была расшифрована нуклеотидная последовательность полного генома *T. tyrosinosolvens* PS2 размером 4.84 Мб (Illumina, MiSeq). В геноме исследуемого штамма обнаружены гены системы атаки алкановой цепи и бета-окисления жирных кислот, позволяющих штамму осуществлять полное окисление алканов до ацетил-КоА.

Известны геномы трех штаммов вида *T. tyrosinosolvens*, представленные в базе данных NCBI: *T. tyrosinosolvens* PS2 (исследуемый штамм), *T. tyrosinosolvens* CCUG 38499 (клинический штамм) и *T. tyrosinosolvens* JCM 15482 (почвенный штамм).

Поиск генетических детерминант патогенности в геномах анализируемых бактериальных штаммов был проведен в программе MP3: Prediction of Pathogenic/Virulent Proteins, по факторам, обуславливающим адгезию, инвазию, секрецию и резистентность микроорганизмов. Для этого использован гибридный подход с применением SVM и HMM моделей для достижения большей точности результатов. Всего обнаружено 533 гена, из которых 516 являлись общими для всех трех штаммов, 7 генов уникальных для штамма *T. tyrosinosolvens* PS2 и 10 генов характерных для клинического и почвенного изолятов.

В углеводородокисляющем штамме *T. tyrosinosolvens* PS2 отсутствовали факторы инвазии, которые участвуют в первичной атаке клеток и тканей организма-хозяина, а именно гены ферментов трипсина и эндопептидазы, расщепляющих пептиды и белки. Отсутствовали гены синтеза псевдоаминовой кислоты, необходимой для движения бактериальной клетки, колонизации слизистых и инвазии в ткани организма-хозяина. Также, не обнаружены ключевые гены системы секреции IV типа, которая зачастую осуществляет секрецию белков вирулентности в эукариотическую клетку. Среди уникальных для штамма *T. tyrosinosolvens* PS2 обнаружены гены бактериофагов, непосредственно факторами патогенности не являющиеся.

Таким образом, выявленные в ходе полногеномного профилирования штамма *T. tyrosinosolvens* PS2 отличия представляют интерес для изучения особенностей метаболизма представителей этого вида. Нехватка генов первичной атаки клеток и тканей организма-хозяина у исследуемого штамма, вероятно, снижает степень его вирулентности. Однако окончательное заключение о безопасности исследуемого микроорганизма будет получено после проведения испытаний на экспериментальных организмах.

Научный Руководитель – А.В. Лайков

УДК 579.61

М. Н. Рыжикова, Е. Ю. Тризна, Е. А. Гаврилова, Л. С. Чернова,

А. Р. Курбангалиева

Казанский федеральный университет

mariaringol@mail.ru

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛИМИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК В УСЛОВИЯХ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

В настоящее время все более актуальным видится моделирование и исследование полимикробных биопленок, в отличие от мономикробных, в которых не учитывается взаимодействие различных микроорганизмов. Совместное сосуществование способствует устойчивости бактерий к антибиотикам, что в конечном счете приводит к низкой эффективности многих антибиотиков, используемых в настоящее время. Производные фуранонов являются одними из кандидатов в качестве препаратов для подавления бактериальных биопленок. Синтезированное ранее производное 2(5H)-фуранон Ф105 эффективно подавляет образование биопленок клетками стафилококков, но не действует на грам-отрицательные бактерии. Это дает возможность моделировать полимикробную биопленку, включающую *S.aureus* и *P.aeruginosa*, где матрикс синтезируется клетками псевдомонады.

Целью работы было установить возможность выживания стафилококка за счет нахождения в биопленке псевдомонады в условиях антибиотикотерапии.

Ранее в нашей лаборатории была получена модель полимикробной биоплёнки, в состав которой входили клетки *S.aureus* и *P.aeruginosa*. Для Ф105 были установлены минимальные концентрации подавляющие рост (МПК) и образование биопленки (МБПК) методом микроразведений. Также мы определили повышение эффективности антибиотика против бактерий в присутствии фуранона Ф105. Клетки бактерий выращивали в среде ВМ в присутствии фуранона в течении 2 суток при температуре 37°C без качания. Затем вносили антибиотик (ванкомицин и ципрофлоксацин) до указанных концентраций и инкубировали в течение суток. После оценивали жизнеспособность клеток в культуральной жидкости и в составе биопленок методом флюоресцентной микроскопии и Drop plate анализа. Для Drop plate анализа были приготовлены серийные 6-кратные разведения жидкой бактериальной культуры из каждой пластиковой чашки в 0.9% NaCl и по 5 мкл суспензии переносили на чашки с LA. КОЕ подсчитывали из капель, содержащих 5-10 колоний.

Для *S.aureus* МПК и МБПК составили 0.5 мкг/мл и 2.5 мкг/мл соответственно. Ф105 не оказывал действия на клетки *P.aeruginosa* при концентрациях до 64 мкг/мл. В составе полимикробной биопленки, включающей *S. aureus* и *P. aeruginosa*, при концентрации фуранона Ф105 10 мкг/мл образовывалась биопленка, в составе которой все бактерии оставались жизнеспособными, что свидетельствует о то что в составе полимикробных биопленок повышается жизнеспособность бактерий.

Drop plate анализ показал, что эффективность антибиотиков в присутствии фуранона Ф105 увеличивалась в 2 и более раз. Дальнейшие исследования будут направлены на поиск причин данных взаимоотношений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект №15-14-00046)

Научный руководитель – А. Р. Каюмов, доцент кафедры генетики ИФМиБ КФУ, к.н.

УДК 579.258:579.266.2

Ю. П. Сергеева¹, В. Ю. Горшков^{1,2}, А. Г. Даминова²,
Ю. В. Гоголев^{1,2}

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

²*Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН*
juliasergeeva_94@mail.ru

ИНДУКЦИЯ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА У ФИТОПАТОГЕННОЙ ЭНТЕРОБАКТЕРИИ *PECTOBACTERIUM* *ATROSEPTICUM* SCRI1043 ПРИ ДЕФИЦИТЕ АЗОТА

Основная часть жизненного цикла микроорганизмов проходит при воздействии разнообразных стрессовых факторов. Для выживания в этих условиях бактерии располагают механизмами направленной модификации метаболизма. При этом, например, в условиях голодания, у бактерий активируются пути использования альтернативных источников питательных веществ и/или энергии, в частности индуцируется синтез ферментов гетеротрофной фиксации CO₂ или фиксации молекулярного азота. У некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в число которых входит *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*), был описан сложный нитрогеназный комплекс, типичный для большинства азотфиксирующих бактерий. Однако, информация об использовании атмосферного азота *Pba* в литературе отсутствует. В связи с этим, целью нашего исследования было выяснение способности к фиксации азота у фитопатогенной энтеробактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в условиях голодания по азоту, а также выявление возможных путей ассимиляции образовавшегося аммония.

Было установлено, что при дефиците азота титр культивируемых клеток в течение 3-х суток снижался с 10^9 кл/мл до 10^7 кл/мл. Клетки приобретали перекрестную устойчивость к окислительному стрессу и солевому и температурному шоку и сохраняли патогенный потенциал в отношении растения-хозяина.

Нами отмечено, что в условиях азотного голодания происходило угнетение экспрессии гена *glnG*, кодирующего глобальный регулятор азотного стресса GlnG, а также генов основного пути включения NH_4^+ в аминокислоты, кодирующих ферменты глутаминсинтазу GlnA и глутаматдегидрогеназу GdhA. В то же время происходила резкая индукция экспрессии генов *nif*-регулона, контролирующего формирование функционального нитрогеназного комплекса, а также активация экспрессии генов *carA* и *carB*, кодирующих α - и β -субъединицы карбамоил фосфат синтазы. Таким образом, фиксированный азот, вероятно, включался в синтез пуринов/пиримидинов, поддерживая гомеостаз нуклеиновых кислот при дефиците азота.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-14-10022.

Научный руководитель – О. Е. Петрова, канд. биол. наук.

УДК 578.56

Е. В. Старикова, Н. Н. Ландышев, М. А. Трегубова

ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва

estarikova@rcpcm.org

CRISPR-СИСТЕМЫ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИОФАГОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИНСТРУМЕНТ КОНКУРЕНТНОЙ БОРЬБЫ

“Тонка вооружений” между фагами и бактериями приводит к возникновению сложных защитных систем, одной из которых является CRISPR-Cas, обеспечивающая адаптивный иммунитет бактерий. Однако в последние годы появлялись сообщения о наличии CRISPR-систем в геномах бактериофагов *Clostridium* и некоторых цианофагов. Предполагалось, что захватываемые бактериофагами CRISPR-кассеты

могут обеспечивать им конкурентное преимущество в борьбе с другими бактериофагами.

Для проверки этого предположения мы проанализировали 2089 фаговых геномов из базы данных RefSeq, в результате чего были обнаружены CRISPR-подобные последовательности в 6 геномах из 2089. В 2 из 6 геномов, имеющих CRISPR-повторы, нами были обнаружены белки Cas4, Cas5 и Cas6. Наличие cas-белков дает основание предполагать наличие работоспособной системы.

В результате сравнения CRISPR-систем бактериофагов и бактерий-хозяев выяснилось, что у бактерий-хозяев CRISPR-повторы либо отсутствуют (*Mycobacterium phage Phrann*), либо не соответствуют таковым у бактериофага. Соответствие повторам бактерий-хозяев удалось обнаружить лишь для фага *Clostridium phage c-st*, однако в CRISPR-повторах фага наблюдалось большее количество замен, чем в повторах разных штаммов бактерий-хозяев. В случае отсутствия у хозяина CRISPR-системы можно предположить, что ее источником стал другой штамм или вид бактерии.

В целях поиска возможных мишеней нами было произведено выравнивание спейсеров из обнаруженных CRISPR-кассет на фаговые геномы, а также на сборки виромов, выделенных из окружающей почвы и пресных водоемов, а также из кишечника животных. Большинство спейсеров выравнивались на последовательности бактериофагов, заражающих тех же бактерий, что может быть косвенным свидетельством конкурентной борьбы. Мишени для некоторых из спейсеров определить не удалось (*Clostridium phage c-st*).

Полученные данные могут косвенно свидетельствовать об использовании CRISPR-систем бактериофагами. Для доказательств гипотезы о конкурентной борьбе требуются экспериментальные подтверждения.

УДК 579.254.4

Е. В. Старикова¹, Ch. Rands², Н. А. Пряничников¹, E. Zdobnov²

¹*ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва*

²*University of Geneva*

estarikova@rcpcm.org

ПОИСК ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ПЕРЕНОСИМЫХ ПУТЕМ ТРАНСДУКЦИИ, С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО И МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Использование антибиотиков в медицине, ветеринарии и промышленности приводит к возникновению антибиотикорезистентных штаммов, в том числе патогенных микроорганизмов. Возникновение лекарственной устойчивости часто связано с горизонтальным переносом генов, осуществляемым мобильными элементами, в том числе бактериофагами. Понимание механизмов передачи генов антибиотикорезистентности позволит в будущем контролировать распространение резистентных штаммов.

Целью нашей работы являлось нахождение свидетельств горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности (АР) при участии бактериофагов посредством общей и специализированной трансдукции. При выполнении работы использовались три *in silico* подхода: предсказание генов АР в составе фаговых геномов, предсказание генов АР в сборках виромов кишечника человека и анализ колокализации генов АР и профагов в метагеномах.

В рамках данной работы нами были созданы скрытые марковские модели (НММ) на основании известных генов антибиотикорезистентности для предсказания их метагеномных вариантов. Также нами был создан пайплайн Phigaro для аннотации профагов в метагеномах и бактериальных геномах. Предсказание генов АР в составе последовательностей вирусоподобных частиц, фаговых геномов и метагеномных сборок производился путем аннотации

предсказанных белков с помощью специфичных НММ. В метагеномных сборках производилось предсказание последовательностей профагов.

С использованием вышеуказанных подходов нами было проанализировано более 1000 образцов метагеномов кишечника человека, 186 образцов виромов кишечника и 2089 фаговых геномов. В метагеномных сборках нами было обнаружено 6 контигов, имеющих гены AP в составе профагов, что соответствует ~0.04% от общего количества контигов. Один из данных профагов был определен как профаг *Lactobacillus mucosae*. В виромных сборках нами было обнаружено 124 контига (0,4 %), несущих гены AP, преимущественно гены устойчивости к тетрациклину. В последовательностях фаговых геномов был предсказан только один ген антибиотикорезистентности, ранее аннотированный у фага SJ46.

Результаты нашей работы могут свидетельствовать о переносе ряда генов антибиотикорезистентности при участии бактериофагов. Также можно предположить, что перенос генов антибиотикорезистентности происходит сравнительно редко.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ № 16-54-21012.

УДК 579.61

З. С. Тошева, А. А. Тойменцева
Казанский федеральный университет
tosheva_zarina@mail.ru

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА ПОДВИЖНОСТЬ БАКТЕРИЙ *MORGANELLA MORGANII*

Подвижность бактерий привлекает внимание исследователей тем, что является важным фактором для колонизации различных поверхностей. *Morganella morganii* - возбудитель комплексных инфекций мочевыводящих путей, катетер-ассоциированной бактериурии, раневых инфекций и сепсиса. За последнее время появляется всё больше информации о различных заболеваниях,

вызванных данными бактериями. В литературе мало данных о способности *M. morganii* к плавающей подвижности и влиянию на нее различных факторов.

Целью работы явилось исследование влияния аминокислот глутамина и триптофана на подвижность разных штаммов *M. morganii*. Объектом исследования были два штамма, выделенные из мочи урологических больных: негемолитический штамм *M. morganii* 1 и гемолитический штамм *M. morganii* 190. Гемолитическую активность бактерий исследовали по гемолизу эритроцитов (2 %) человека. Подвижность исследовали на полужидкой среде LBA, содержащей 0.33 % агара, при температурах 30 и 37 °С. Аминокислоты вносили в конечной концентрации 0.5 % и подвижность оценивали по диаметру колонии.

Результаты. Было показано, что оба уропатогенных штамма *M. morganii* способны к подвижности в полужидкой среде. Однако подвижность бактерий по-разному зависела от температуры культивирования. Так подвижность негемолитического штамма *M. morganii* 1 не зависела от температуры: на 7 час роста при 30 и 37°С диаметр колоний достигал 50 мм. В тоже время штамм 190 проявлял способность к плавательной подвижности только при 30°С (диаметр колонии на 7 час достигал 45 мм). При повышении температуры до 37°С наблюдалось сильное ингибирование плавательной подвижности штамма 190 (диаметр колонии на 7 час роста достигал всего 13 мм). Максимальная скорость подвижности бактерий наблюдалось с 4 по 7 час культивирования при 37 °С.

Внесение в среду глутамина незначительно подавляло подвижность бактерий при тех же условиях. Диаметр колонии на 7 час роста *M. morganii* 1 при 30 °С достигал 48 мм, а *M. morganii* 190 – 35 мм. При 37°С диаметр колонии штамма 1 достигал 41 мм, а штамм 190 – 6.5 мм. Таким образом, при 30°С в присутствии глутамина бактерии обеих штаммов двигаются активнее, чем при 37°С.

Внесение в среду триптофана ингибировало подвижность бактерий сильнее, чем глутамин. На 7 час роста диаметр колоний *M. morganii* 1 достигал 23 мм при 30°C, а *M. morganii* 190 – 7.5 мм; при 37°C *M. morganii* 1 – 27.5 мм, а штамм 190 – 7.5 мм. Таким образом, в присутствии 0.5% триптофана подвижность бактерий снижалась практически в два раза. Кроме того, в присутствии триптофана в среде наблюдали пигментацию колонии и среды вокруг колонии начиная с 4 час роста. Пигмент имел оранжево-коричневый цвет.

Таким образом, показано, что подвижность бактерий *M. morganii* различается у разных штаммов, по-разному зависит от температуры культивирования и ингибируется в присутствии различных аминокислот. Известно, что ингибирование подвижности бактерий происходит при инициации образования биопленки, что является важным этапом колонизации поверхности эпителия или катетеров. Регулирование подвижности бактерий разными факторами может быть важно для адаптации бактерий к условиям *in vivo* при инфекции.

Научный руководитель – А. М. Марданова, канд. биол. наук, доцент.

УДК 579.68

А.С. Трунякова, Е.А. Зацаринная

Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина

Sasha_trunyakova@mail.ru

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОТОКОВ Г. РЯЗАНИ

Реки, протекая через территории городов и других густонаселенных территорий, выполняют роль естественного дренажа речных долин, аккумулируя в себе все загрязнители, имеющиеся на данной территории. Последствия этого воздействия проявляются в количественных и качественных характеристиках водной среды, и в

первую очередь воздействуют на процессы самоочищения, нарушая деятельность микробного сообщества данного водотока.

С целью оценки процессов микробного самоочищения и гигиенического состояния были отобраны пробы вод из рек Трубеж, Плетенка, Павловка, Листвянка и Лыбедь. Эти реки являются наиболее крупными водотоками на территории города Рязани, относящимся к бассейну р. Ока. Речные долины этих рек охватывают практически всю территорию Рязани (являющегося крупным промышленным центром), поэтому испытывают на себе огромную антропогенную нагрузку, что и послужило причиной для исследования их экологического состояния. Для получения общей картины состояния исследуемых водотоков было решено проследить сезонную динамику численности микроорганизмов, поэтому отбор проб происходил в осенний период 2015 г. и весенне-летний период 2016 г. В рамках исследования было определено общее микробное число (ОМЧ) аллохтонных (t инкубации 37°C) и автохтонных (t инкубации 21°C) микроорганизмов, а также индекс МАФАНМ – соотношение ОМЧ 21°C : ОМЧ 37°C . Для оценки санитарно-гигиенического состояния определяли содержание общих (ОКБ) и термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ).

Выявлено, что в весенне-летний период наблюдали закономерное преобладание автохтонной микрофлоры над аллохтонной во всех водотоках. Численность автохтонных микроорганизмов в этот период находилась в пределах 10^3 - 10^4 КОЕ/мл. Максимальное число автохтонных микроорганизмов определено в р. Лыбедь ($9.7 \cdot 10^3$ КОЕ/мл). В осенний период численность этой группы микроорганизмов в пробах воды оказалась на порядок выше. Наиболее неблагоприятная ситуация сложилась в водных экосистемах рек Трубеж и Павловка: в этих реках число авто- и аллохтонных микроорганизмов практически идентично, что свидетельствует об интенсивном загрязнении хозяйственно-бытовыми сточными водами и нарушении процессов естественного самоочищения рек.

Осенью из-за интенсивного разложения растительных остатков и интенсивного попадания микроорганизмов в поверхностные водные объекты с дождевыми и ливневыми стоками происходит сильное

увеличение численности аллохтонной микрофлоры по отношению к автохтонной. Этот процесс наблюдается в реках Трубеж, Павловка и Листвянка. В этих водных объектах индекс МАФАНМ меняется в зависимости от сезона. Так, в весенне-летний период индекс не превышает 2, а в осень стремится к нулю. Тогда как, в р. Плетенке и Лыбеди на протяжении всех сезонов наблюдается высокая способность к самоочищению (МАФАНМ > 4).

Средний уровень содержания общих и термотолерантных колиформных бактерий во всех реках в осенний и весенне-летний периоды не соответствовал гигиеническим нормативам (СанПиН 2.1.5.980-00), причем в водах рек Павловка и Лыбедь численность в весенне-летний период превышала 104 КОЕ/100 мл, что свидетельствует об значительном загрязнении неочищенными сточными водами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Рязанской области в рамках научного проекта № 16-44-620157 "p_a".

Научный руководитель – Е.А. Зацаринная

УДК 579.64

Г.Ф. Хадиева¹, С.Г. Вологин², З. Сташевски²,
Н.К. Мочалова¹, Л.И. Гарипова¹, М.Т. Лутфуллин¹

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Татарский НИИ сельского хозяйства, г. Казань*

g.h95@mail.ru

ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ СУХОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ

Фитопатогенные грибы – возбудители инфекционных болезней растений, способные наносить огромный ущерб урожаю экономически важных сельскохозяйственных культур. В последние годы изменение агроклиматических условий и ухудшение экономического состояния хозяйств в Республике Татарстан (РТ) привели к массовому

распространению фитопатогенных микромицетов – возбудителей сельскохозяйственных культур. В частности, возросла численность и разнообразие грибов рода *Fusarium*, которые способны сохранять жизнеспособность в почве в виде спор до 30 лет и более. Некоторые виды рода *Fusarium* способны синтезировать микотоксины, которые могут стать причиной серьезных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. Фузариозное увядание растений картофеля и сухая гниль клубней, представляют особую опасность, вызывая большие потери урожая.

Работа посвящена выделению и идентификации возбудителей сухой гнили картофеля. В ходе работы были выделены и идентифицированы фитопатогенные микромицеты – возбудители сухой гнили картофеля. В работе были использованы образцы картофеля сортов Регги, Ароза, Ред Скарлет, Невский собранных с опытных полей ТатНИИСХ (Татарстан).

Клубни картофеля с признаками сухой гнили промывали водопроводной водой, подсушивали и протирали тампоном, смоченным 96%-ным этиловым спиртом. Из пораженного участка клубней стерильным скальпелем вырезали кусочки размером 2x2 см и раскладывали на поверхность среды Чапека в чашках Петри. Чашки инкубировали во влажной камере при 28°C до 7 сут. Для выделения чистых культур микромицетов проводили многократный пересев колоний, выросших вокруг исследуемых образцов картофеля, в среду Чапека на чашках Петри. Полученные изоляты контролировали микроскопированием на отсутствие посторонней микрофлоры.

Из клубней картофеля сортов Регги, Ароза, Ред Скарлет, Невский были выделены 48 изолятов микромицетов. На основе выделенных изолятов создали коллекцию фитопатогенных микромицетов. Для длительного хранения и сохранения жизнеспособности культур – суспензию спор и мицелия микромицетов хранили в криопробирках под 70% глицерином при -80°C.

Родовая принадлежность изолятов была установлена по морфологическим признакам с помощью микроскопирования. Среди

выделенных изолятов были выявлены микромицеты родов *Fusarium* в количестве – 39 штаммов, *Colletotrichum* – 7, *Alternaria* – 2.

Таким образом, было установлено, что основными возбудителями сухой гнили картофеля возделываемой на территории РТ являются микромицеты рода *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Alternaria*. Наиболее распространёнными являются микромицеты рода *Fusarium*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 17-44-160481.

Научный руководитель – А.М. Марданова, канд.биол.наук., доцент.

УДК 579.84

Д.Ю. Шаравин

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь
dima-sharavin@yandex.ru

АССОЦИАТИВНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *HALOMONAS* ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ ЗАСОЛЁННЫХ ПОЧВ

Согласно современным представлениям, метилотрофные фитосимбиотические бактерии являются глобальными потребителями метанола, выделяемого растениями в процессе их жизнедеятельности. Показано, что некоторые ассоциированные с растениями метилотрофы способны не только фиксировать молекулярный азот, но и синтезировать фитогормоны и осмопротекторы, тем самым оказывая положительное влияние на жизнеспособность растения-хозяина, включая продуктивность и устойчивость к стрессовым факторам.

В представленной работе рассматриваются изоляты, выделенные из образцов ризосферы растений (*Sonchus arvensis* L., *Poa pratensis* L., *Calamagrostis epigeios* L., *Juncus* sp. L., *Hordeum jubatum* L., *Chenopodium* sp. L.) произрастающие на техногенно-засолённых почвах г. Соликамск (Пермский край). При многократном пересеве на жидкой и

агаризованной среде Гальченко с 2% NaCl и 1% метанола в качестве единственного источника углерода выделено 6 штаммов галотолерантных бактерий со сходной морфологией колоний. На основании секвенирования последовательности гена 16S рРНК данные штаммы наиболее сходны с представителями рода *Halomonas*. В данной зоне техногенного засоления *Halomonas* spp. ранее были выделены несколькими группами исследователей, но в качестве метилотрофных бактерий не рассматривались.

Однако среди полногеномных сиквенсов исследуемой группы микроорганизмов, доступных в базе данных GenBank, обнаружены последовательности аннотированные как пирролохинолинхинон-зависимая метанолдегидрогеназа, либо схожие с геном метанолдегидрогеназы *mxaF* – ключевым ферментом пути ассимиляции метанола. Данные компоненты обнаружены, в частности, у следующих представителей рода *Halomonas*: *H. aestuarii* Hb3 (CP018139), *H. chromatireducens* AGD 8-3 (CP014226), *H. elongata* DSM 2581 (FN869568), *H. huangheensis* BJGMM-B45 (CP013106), *H. xinjiangensis* TRM 0175 (NZ_JPZL01000001) и *H. zincidurans* B6 (NZ_JNCK01000001).

Методом ПЦР, используя праймеры сконструированные для амплификации гена *mxaF* у представителей рода *Methylophaga* (MFGmxa2-f 5'-GGAACGAAACCATGCGTCCTGG и MFGmxa2-r 5'-CCCTGGTTGTGGAAACCCAT), для ряда изолятов *Halomonas* были получены чёткие продукты реакции, сходные по размеру с предсказанным *in silico* (около 370 п.н.). Тем не менее, для дальнейшего изучения метилотрофной функции у представителей рода *Halomonas* необходимо провести анализ ферментативной активности, используя радиоактивно-меченные одноуглеродные субстраты.

УДК 577.152.277:578.832.1

Р. Шах Махмуд, М. И. Маркелова, И. А. Летова, В. В. Ульянова

Казанский федеральный университет

raihan.shah@kpfu.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОРНК ИЗ КЛЕТОК, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА А (H1N1)

МикроРНК играют регуляторную функцию в организме эукариот. Их количественный и качественный состав варьирует в зависимости от условий среды, типа клеток и организма. При заражении клеток вирусом экспрессия ряда генов на уровне матричных РНК подавляется из-за микроРНК. Таким образом, информация о тотальной микроРНК вирус-зараженных клеток дает базовое представление о проходимых в клетке изменениях и способствует пониманию молекулярного механизма вирусной инфекции. Таким образом, целью настоящей работы явилось выделение микроРНК из вирус-зараженных клеток для последующего секвенирования и биоинформатического анализа.

В работе были использованы эпителиальные клетки легких человека и пандемический вирус гриппа А (H1N1pdm). Вирусологические исследования проводили в лаборатории уровня биобезопасности BSL-2. Клетки, выращенные в течение 24 ч до 100% конфлюентности, заражали вирусом в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре и выращивали до завершения первого цикла репликации вируса. Тотальную РНК клеток выделяли при помощи реагента «TRIzol» («Thermo Fisher Scientific», США) по инструкции производителя. Выделение микроРНК из тотальной РНК проводили с помощью парамагнитных частиц («Beckman Coulter», США) по протоколу производителя с модификациями. К магнитным частицам добавляли 0.5 объема тотальной РНК после предварительной

обработки при температуре 70° С в течение 2 мин. Удаление длинных РНК и примесей проводили с помощью 80% этанола стандартным методом с последующей элюцией водой без РНКаз («Ambion», США). Качественный анализ полученных тотальной, малых и микроРНК проводили на биоанализере («Agilent Technologies», США). Приготовление библиотеки микроРНК проводили с модификацией протокола «SOLiD Total RNA-Seq Kit» («Thermo Fisher Scientific», США). Секвенирование выполняли на секвенаторе следующего поколения «SOLiD 5500xl wildfire» («Thermo Fisher Scientific», США). Биоинформатический анализ проводили с использованием базы «Ensembl». В качестве референсного генома использовали полный геном человека (GCA_000789425.2). МикроРНК были выровнены с использованием «miRBase» версии 14.0.

В ходе исследования из зараженных клеток были выделены 369 малых РНК, среди них - 115 зрелых и незрелых микроРНК. В работе проанализировали 67 зрелых микроРНК. Выделенные нами микроРНК имели отношение к сердечно-сосудистой (21%), иммунной (21%), гормональной (12%) системам и канцерогенезу (22%). Установлено, что экспрессия hsa-mir-3923, отвечающая за рак легких снижена в 400 раз при заражении вирусом.

Секция Общая биология

УДК 634.551+ 634.1-15

A.M. Badran^{1,2} I.Y. Savin^{2,3}

¹ Desert Res. Center, Cairo, Egypt.

² *Agrarian-Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia*

dr_antar_mahmoud@yahoo.com

³ *V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russia*

savin_iyu@esoil.ru

**EFFECT OF NANO-FERTILIZER ON SEED GERMINATION
AND FIRST STAGES OF BITTER ALMOND SEEDLINGS
GROWTH UNDER SALINE CONDITIONS**

This experiment was conducted to investigate the effect of nano-fertilizer on seed germination and the first stages of bitter almond growth compared to other chemical fertilizers under saline conditions. In this regard, nuts were soaked in salt solutions of NaCl as 1, 3, and 5 dsm-1 for 48 hours prior to stratification. Subsequently, the seeds were sown in perlite and treated by different concentrations of urea, ammonium sulfate and nano-fertilizer at 0%, 25%, 50% and 100% for each fertilizer under different saline concentrations then stratified at 6 °C for eight weeks. After cold stratification, non-germinated seeds were exposed to 22°C for three weeks to promote germination. Germinated seeds were sown in pots with a mixture of peat and perlite. The treatments were arranged in a randomized complete block design in factorial experiment with three replications and 25 seeds for each replicate. Germination measurements and first stages of growth parameters were estimated. The results revealed that, nano-fertilizer affected significantly on seed germination and first stages of bitter almond growth under saline conditions. Whereas, soaking and irrigation of bitter almond seeds with high salt concentrations reduced germination measurements, stem length and diameter comparing to the lowest salt concentrations. However, elongation of secondary and primary

root/plant and number of secondary roots/plant markedly increased under high salt concentrations; therefore, such transplants adapted and gained an ability to tolerate high salt concentrations. This resistance and adaptation were markedly improved under nano-fertilizer treatments through its vital role in increasing the moisture content of seed thus positively increased germination percentage and rate. This from one hand and from another, all amount of nano-fertilizer was covered by plants via slowly and continuously release of fertilizer therefore producing stronger seedlings. However, nano-fertilizer decreased the adverse effects of salinity on seed germination and enhanced the ability of seedlings to tolerate salt stress compared to other chemicals fertilizers under the study.

УДК 574.587

Л. Е. Буторова^{1,2}, Р. П. Токинова², А. Г. Порфирьев¹

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Институт проблем экологии и недропользования, г. Казань*

lyudmilabutorova@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МАКРОЗООБЕНТОСА В ОЗЕРЕ БОЛЬШОЕ ГОЛУБОЕ (ТАТАРСТАН)

Макрозообентос является важным структурным звеном водоемов и оказывает значительное влияние на функционирование их экосистем. Данное исследование макрозообентоса проведено на солонатоводном карстовом озере Большое Голубое – уникальном природном объекте, расположенном на территории государственного природного заказника «Голубые озера» (Татарстан). Озеро принадлежит бассейну реки Казанка (левый приток р. Волга) и обладает рядом специфических особенностей, таких как наличие глубоких карстовых воронок (15,7–17,5 м), повышенный уровень минерализации (2,2–2,5 г/л), интенсивный водообмен (до 500 л/сек), голубой оттенок и высокую прозрачность

(более 17 м) воды. Своеобразные условия водной среды оказали влияние на формирование состава и структуры донного населения гидробионтов. Здесь образовался специфичный видовой комплекс из организмов макрофитобентоса и макрозообентоса, в составе которого представлены как эврибионтные широко распространенные формы, так и редкие виды. Первые сведения о донной фауне оз. Бол. Голубое были получены в 1938–1939 годах Х.М. Курбангалиевой, затем в 1995–2001 гг. в ходе комплексных исследований данные были обновлены. В данной работе нами изучены состав, количественные и пространственно-временные характеристики макрозообентоса оз. Бол. Голубое за период 2015–2016 гг.

Пробы макрозообентоса отобраны на 5 станциях, охватывающих наиболее характерные озерные биотопы. На глубоководных участках использован дночерпатель Петерсена (площадь захвата 0,025 м²), а на мелководье – количественная рамка (18*25 см) и гидробиологический сачок. Отбор и обработка материала проведены в соответствии с общепринятыми гидробиологическими методами.

В период исследования в составе макрозообентоса оз. Бол. Голубое зарегистрировано 62 вида, принадлежащие к 7 классам: насекомые (Insecta), поясковые черви (Clitellata), ресничные черви (Rhabditophora), ракообразные (Crustacea), гидроидные (Hydrozoa), паукообразные (Arachnida) и брюхоногие моллюски (Gastropoda). По частоте встречаемости в биоценозах озера наиболее обычными видами являются ракообразные *Asellus aquaticus* (91%), *Gammarus pulex* (76%), хирономиды *Cricotopus* sp. (86%), *Micropsectra* sp. (48%) и планария *Polycelis tenuis* (60%).

Количественное развитие макрозообентоса в озере достигает высоких значений. Общая численность (средние значения за 2016 г.) варьирует в пределах от 4,1 тыс. экз./м² в биоценозе водных мхов на склоне карстовой воронки (ст. 2) до 10,5 тыс. экз./м² в биотопе серых илов на мелководьях озера (ст. 3); общая биомасса изменяется от 14,2 г/м² (ст. 3) до 47 г/м² в биоценозе харовой водоросли (ст. 4). При

сравнении зообентоса разных станций с использованием индекса биоценотического сходства Шонера в озере выделены два основных типа сообществ: фитофильное (ст. 2 и ст. 4) с доминированием ракообразных и пелофильное (ст.3) с доминированием хирономид. В ходе наблюдений с апреля по октябрь 2016 г. выявлены различия в характере сезонной динамики фитофильных и пелофильных сообществ макрозообентоса, обусловленные особенностями биологии доминирующих видов.

Научные руководители – Р. П. Токинова, канд.биол.наук, зав. лаб. гидробиологии ИПЭН АН РТ . А. Г. Порфирьев, канд.биол.наук, доцент КФУ

УДК574.24

K.P. Vereshchagina, D.S. Bedulina, A.N. Gurkov,
D.V. Axenov-Gribanov, M.A. Timofeyev
Irkutsk State University
k.p.vereshagina@gmail.com

GENE EXPRESSION PROFILE IN BAIKAL AND HOLARCTIC SPECIES AMPHIPOD IN RESPONSE TO RAISING TEMPERATURES

Temperature is one of the most important environmental factors for aquatic organisms due to its direct effects on all biological processes - from the molecular to the physiological and behavioral hierarchy of organization. Changes in habitat temperature can occur on a wide temporal range - from daily or tidal cycles to large-scale climatic fluctuations. Thus, understanding of thermal ranges and limits of organisms becomes increasingly important in the light of climate change and its observed effects on ecosystems (Pörtner and Gutt, 2016).

The aim of our study was to investigate the expression of several key metabolic genes in response to gradually increasing temperature (0.8°C per day) in two Baikal endemic amphipods and one common Holarctic species.

The studied species will cope with the projected global warming during the next decades (IPCC, 2007). In this context, the thermal tolerance of aquatic organisms can be considered as a crucial biological trait.

For the gradual temperature increase experiment, tanks with amphipods acclimated to 6°C were placed to the laboratory incubator and water temperature was increased by 0.8°C per day. The rate of increase intended to resemble natural conditions of the upper littoral zone of Lake Baikal as maximal temperatures can reach about 20°C in summer (Timoshkin, 2001), whereas in spring/early summer temperatures of around 5-6°C prevail in the upper littoral. The experimental temperature increase slightly exceeded temperature changes in the natural habitat (regarding the thermal increments and the maximum temperature) in order to account for a climate warming scenario. Control groups of amphipods were kept at $6 \pm 0.8^\circ\text{C}$ in a laboratory incubator during the entire experimental period.

Expression of heat shock proteins 70 (hsp70) significantly increased in the endemic Baikal species *E. cyaneus* and the Holarctic *G. lacustris* at 23.6°C (after 22 days of gradual warming exposure), compared to the parallel (time) control. In another Baikal endemic amphipod - *E. verrucosus* - gradual temperature exposure resulted in increased hsp70 expression at 23.6°C, however, only when compared to the expression level in start control samples. In the Baikal endemic *E. cyaneus*, expression of oxoglutarate dehydrogenase and hexokinase also increased at 23.6°C. Expression of atp synthase subunit alpha significantly decreased in this species after 16 days of gradual warming (at 18.8, 22 and 23.6°C, respectively). This could indicate the regulation of energy metabolism in *E. cyaneus* in response to temperature stress, which was not observed in the other two species. Correlation network analysis revealed different strategies of energy supply and stress-response (hsp70 induction) under increasing temperatures in the studied species.

This research was supported by the, Russian Science Foundation (#17-14-01063). "Goszadanie" (6.1387.2017/4.6) and Russian Foundation for Basic Research (#15-29-01003, 16-34-00687, 15-04-06685, 16-34-60060).

Научный руководитель – М.А. Тимофеев, д-р. биол. наук, проф.

УДК 574.587

А. Е. Вирченко¹, М. В. Макаров², Р. М. Сабиров¹

¹Казанский федеральный университет

²Институт морских биологических исследований, г. Севастополь

ale-virchenko@yandex.ru

СООБЩЕСТВО ЭПИБИОНТОВ МАКРОФИТА *CYSTOSEIRA CRINITA* ЧЁРНОГО МОРЯ В РАЙОНЕ Г. СЕВАСТОПОЛЬ

Изучения структуры сообществ эпибионтов прибрежных макрофитов имеет важное индикаторное значение и позволяет определять экологическое состояние прибрежной зоны водоемов. *Cystoseira crinita* Duby 1830 растёт в экологических чистых, хорошо аэрированных районах. В районах с техногенными загрязнениями она приобретает угнетённое состояние. Также изменяется структура сообществ эпибионтов. Целью наших исследований – изучение видовой структуры и количественных показателей макроэпибионтов макрофита бурой водоросли *C. crinita* в окрестностях м. Фиолент у г. Севастополь.

Материалом исследования были сборы макроэпибионтов с талломов бурой водоросли *C. crinita*, собранные в сублиторали м. Фиолент 27.09 2016 года

В сообществе эпибионтов *C. crinita* в верхней сублиторали акватории вблизи мыса Фиолент обнаружено 28 видов и таксонов гидробионтов, представителей 5 типов (Foraminifera, Nematoda, Polychaeta, Mollusca, Arthropoda) и 7 классов. Самым многочисленным таксоном среди эпибионтов таллома цистозире является тип Arthropoda, с доминирующим семейством Harpacticidae. В сборах всего было найдено 192 экземпляра гарпактицид, что составило около 18% от общей численности всех гидробионтов в пробах. Самым массовым видом в сообществе эпибионтов талломов цистозире явилась амфипода *Amphithoe ramondi*. Её численность составляла от 7 до 35 экз./на 1 таллом. Данный вид амфипод строят домики из растительных фрагментов на талломе исследованной водоросли, являясь аборигенным

видом ценоза эпибионтов цистозир. Двенадцать таксонов представлены во всех точках сбора и являются, очевидно, типичными для сообщества эпибионтов цистозир: *Amphithoe ramondi* Rissoa *splendida*, *Tricolia pulla*, *Nereis zonata*, *Spirorbis pagenstecheri*, *Hyppolyte longirostris*, *Mytilaster lineatus*, *Spaeroma serratum*, *Parchyale taurica*, *Caprella acantifera ferox*, Harpacticidae sp., Nematoda sp. Наиболее редкими видами в наших пробах явились *Elphidium ponticum* (Foraminifera) и *Actacarus pygmaeus* (Acari). Очевидно, прибойная зона верхней сублиторали не является благоприятным биотопом фораминифер и морских клещей.

В целом, сообщество эпибионтов бурой водоросли *S. crinita* в верхней сублиторали исследованного участка Черного моря вблизи мыса Фиолент по признакам таксономического разнообразия, численности и биотическим взаимосвязям может рассматриваться как таксоценоз ракообразных Crustacea.

Научные руководители – канд. биол. наук доцент Р. М. Сабиров; канд. биол. наук н.с. М.В. Макаров.

УДК 574.5

Е. М. Долинская, Д. Ю. Карнаухов
Иркутский государственный университет
ekaterina.dolinskaya@bk.ru

ОСОБЕННОСТИ ГОРИЗОНТАЛЬНЫХ МИГРАЦИЙ ПЕЛАГИЧЕСКОЙ АМФИПОДЫ *MACROHECTORUS BRANICKII* (DUB.) В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗ. БАЙКАЛ

Пелагическая амфипода *Macrohectorus branickii* является важным компонентом пищевой цепи озера Байкал и активным участником суточных вертикальных миграций (СВМ) гидробионтов. Кроме того, периодически имеют место вертикальные миграции в литоральную зону.

Для изучения горизонтальной миграционной активности особей был выбран ряд точек в бух. Б. Коты на литоральной платформе,

различающихся по абиотическим факторам. Наблюдения на точках проводили с использованием видеосистемы для подводной съемки.

Проведенные наблюдения выявили следующие особенности. Появление особей макрогектопуса было отмечено в ноябре 2016 г. на следующих точках - у действующего пирса, у подводного свала и напротив мыса Скриппер, а в феврале 2017 г. только на точке у подводного свала. На точке у действующего пирса (гл. 3 м) особи макрогектопуса были отмечены только во время последнего наблюдения в 06:00. В июне 2016 г. особи макрогектопуса на точке у действующего пирса замечены не были.

Настоящая работа выполнена при поддержке - Минобрнауки РФ 6.1387.2017/ПЧ, 6.9654.2017/БЧ и гранта Фонд поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал».

Научный руководитель – Е. А. Зилов, д-р. биол. наук.

УДК 594.582.4

А.И. Ильясова, А.В. Голиков, Р.М.Сабиров

Казанский федеральный университет

ailyasova95@gmail.com

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЧЕЛЮСТНО-РАДУЛЯРНЫХ АППАРАТОВ ДВУХ ВИДОВ СЕПИОЛИД (*SEPIOLIDA*, *CERHALOPODA*) ИЗ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

Головоногие моллюски – важная и многочисленная составляющая экосистемы Мирового океана. В последние годы наблюдается повышенный интерес к Арктике, вызванный спорами о возможных климатических изменениях в этом регионе. В то же время биология арктических гидробионтов, в том числе и головоногих моллюсков, остается слабоизученной. До недавнего времени считалось, что в Баренцевом море постоянно обитает лишь 2 вида сепиолид рода *Rossia* – *R. moelleri* Steenstrup, 1856 и *R. palpebrosa* Owen, 1834, имеющая 2 формы неустановленного таксономического

статуса – «*palpebrosa*» с множеством папилл на дорсальной стороне головы и мантии и гладкую «*glaucopis*». Однако, в ходе изучения *R. palpebrosa*, нами был отмечен еще один вид – *R. megaptera* Verrill, 1881, который прежде не отмечался в Баренцевом море. Внешне он схож с гладкой формой *R. palpebrosa*, однако эти виды имеют множество различий на микроморфологическом уровне, в том числе и в строении челюстно-радулярного аппарата.

Материалом для исследования послужили сборы десятируких головоногих моллюсков, предоставленные Полярным НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии (г. Мурманск) и Институтом морских исследований (г. Тромсё, Норвегия). Было обработано 120 особей *R. palpebrosa* с III по V₂ стадии зрелости (длина мантии (ДМ) 19–56 мм) и 19 особей *R. megaptera* с III по V₂ стадии зрелости (ДМ 19–42 мм). У каждой особи извлекался буккальный конус, содержащий клюв и радулу. Изучаемые структуры были выделены с помощью пинцета. Клювы, состоящие из верхней и нижней челюстей, были измерены по общепринятой схеме. Статистическая обработка материала проводилась в программах Microsoft Excel и Statistica 10. Изучение микро- и макроморфологии проводилось с помощью световой и растровой электронной микроскопии.

Морфология клювов изученных видов типична для сепиолид, в его структуре наиболее изменчивой оказалась верхняя челюсть. Нами было выделено 3 формы челюсти по степени изогнутости режущего края ее роострума: прямая (режущий край практически не изогнут), когтевидная (режущий край сильно изогнут, напоминает по форме коготь) и промежуточная. У *R. palpebrosa* были встречены все формы роострума, наиболее распространенная – промежуточная, наименее – когтевидная, которая встречалась только у самцов. У некоторых особей также был отмечен дополнительный угол, представляющий собой углубление на режущем крае, который встречался в комбинации с любой формой роострума и не имел закономерности в

распространении. Верхний рострум *R. megaptera* имеет прямую или промежуточную форму и не несет дополнительный угол.

Рост клювов носит отрицательный аллометрический характер.

Найдены достоверные различия в микроморфологии радулы. У обоих видов радулы гомодонтные, их общая формула – 2:1:1:1:2. Для *R. palpebrosa* характерна радула, состоящая из невысоких зубцов практически правильной треугольной формы с притупленными вершинами. У *R. megaptera* радула имеет более «хищный» вид и состоит из длинных тонких заостренных зубцов в форме неправильных треугольников, резко расширяющихся у основания.

Таким образом, анализ изученных структур подтвердил, что *R. megaptera* действительно является самостоятельным видом.

Научный руководитель – А.В. Голиков, канд. биол. наук.

УДК 574:591.5

Я. Я. Тыньо, М. А. Имбер

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина
yytynio@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ХИЩНИЧЕСТВА НА ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СООБЩЕСТВ

Динамика численности популяции жертв связана с размножением специфических и неспецифических хищников. Повышение численности и разнообразия хищников оказывает существенное воздействие на видовой состав жертв. Известны случаи, когда в озерах крупные виды зоопланктонов заменялись более мелкими после вселения питающихся ими рыб, которых ранее в этих озерах не было. Главное условие для хищника при выборе жертвы — ее соответствие морфологическим, сенсорным и поведенческим особенностям хищника.

Цель работы — оценить влияние хищничества на видовое разнообразие сообществ на различных экологических моделях.

Среди насекомых взаимодействия видов сложились эволюционно таким образом, что практически в каждой среде на каждый вид насекомого есть свое насекомое-хищник, как правило, полифаг. Для насекомых совпадение микростаций обитания играет важную роль. В ходе исследований был проведен сбор муравьёв и тлей в течение теплого периода года, обследованы различные места обитания муравьёв. Всего было выявлено 29 видов муравьёв из 10 родов 2 подсемейств, а также 137 видов тлей из 53 родов 8 семейств. Влияние муравьёв на встречаемость в биотопах тлей оценили с помощью теста Фишера.

Установлено, что рост числа видов муравьёв сопровождается увеличением количества видов тлей в биотопе. Имеет место быть и гипотеза, что хищники и паразиты помогают поддерживать плотность популяций растительноядных насекомых на низком уровне так, что последние не уничтожают собственные источники пищи и не разрушают собственные местообитания.

В качестве примера роста популяции жертв в ответ на понижение давления хищников может служить ситуация с оленями на плато Кайбаб, численность которых увеличилась с 4000 голов в 1907 г. до 100000 в 1924 г., что совпало с организованной правительством кампанией по борьбе с хищниками. В 1970 г. было показано, что из-за вспышки численности оленей популяция истощила свою кормовую базу и затем уменьшилась. В случаях, когда экосистема относительно мала, один или несколько видов хищников способны контролировать как размерный, так и видовой состав всего трофического уровня.

Таким образом, была проведена оценка влияния хищничества на видовое разнообразие сообществ. Установлено, что хищник выбирает жертву по удобным для себя признакам, что хищник и жертва регулируют численность друг друга. Помимо этого, регулировка численности также зависит от определенного ареала и потенциала кормовой базы, то есть если ареал позволяет, то с ростом числа жертв растет и количество хищников, и наоборот. Но если ареал не позволяет,

то хищник регулирует численность жертв и не дает популяции вырасти до губительного размера.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 574.5

Д. Ю. Карнаухов, О. О. Русановская, Е. М. Долинская

Иркутский государственный университет

karnauhovdmitrii@gmail.com

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГОДОВОЙ ДИНАМИКИ ЧИСЛЕННОСТИ ПЕЛАГИЧЕСКОЙ АМФИПОДЫ *MACROHECTOPUS BRANICKII* (ДУВ.) В ОЗ. БАЙКАЛ

Амфипода *Macrohectopus branickii*, на данный момент, является единственной известной пресноводной пелагической амфиподой в мире и занимает уникальное положение в экосистеме оз. Байкал.

Для изучения динамики численности *M. branickii* были использованы пробы, полученные с помощью планктонной сети Джели (с различной глубины) на «Точке №1». Точка находится в 2,7 км от берега напротив бухты Большие Коты (Южный Байкал).

Анализ данных выявил ряд особенностей. Оказалось, что численность и структура скоплений *M. branickii* неоднородны и различаются как по месяцу, так и по глубине. Наиболее бедный состав скоплений отмечается в марте и декабре. В марте единственная пойманная самка оказалась неполовозрелой.

С мая начинается увеличение числа макрогектопуса. Пик численности молоди приходится на июнь, а также прослеживается общая тенденция увеличения числа особей и уменьшения глубины, так отдельные особи отлавливаются в утренние часы даже в поверхностном десятиметровом слое.

Настоящая работа выполнена при поддержке - Минобрнауки РФ 6.1387.2017/ПЧ, 6.9654.2017/БЧ и гранта Фонд поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал».

Научный руководитель – Е. А. Зилов, д-р. биол. наук.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПОНГИОФАУНЫ (SPONGIA) В ЗАПАДНОЙ АКВАТОРИИ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

Баренцево море – важный район для добычи биологических ресурсов в Арктике. В донных биоценозах одними из доминирующих животных являются губки. Они образуют «губочные леса» в западных частях Баренцева моря. Знания о закономерностях распределения и видовом разнообразии губок Арктики не могут обеспечить нам вида полной картины. Цель данной работы – изучение видового состава и основных особенностей экологии губок западной части акватории Баренцева моря. Сборы материала производились в Западном желобе Баренцева моря. В норвежском рейсе «Campelen» Ecosystem Survey на НИС «Johan Hjort» с 30 августа по 05 октября 2011 г были произведены сборы материала. Было собрано и определено 39 экземпляров губок с 77 точек сбора. Губки были обнаружены только лишь на 22 станциях. Материал был идентифицирован, в соответствии со стандартной методикой. Фотографии внешнего вида были сделаны при помощи исследовательского микроскопа Zeiss с USB-окуляром, спикулы – сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM-1000.

Было определено 24 вида губок из 19 родов, 16 семейств, 7 отрядов (Poecilosclerida, Suberitida, Tethyida, Tetractinellida, Axinellida, Polymastiida, Harposclerida) и 1 класса (Demospongia). Самым богатым по таксономическому разнообразию стал отряд Poecilosclerida, представленный 7 семействами, 8 родами и 8 видами. Таксономически самым бедным - отряд Tethyida, единственным

представителем которого стал вид *Tethya norvigica*. Наибольшее число видов встретилось на северном и южном склоне Медвежинского желоба, а также на восточном склоне Шпицбергенской банки и на западном склоне банки Персея. В этих точках в сборах присутствовало по 3-4 экземпляра. Беднее всего в количественных показателях стали сборы во многих глубоководных районах исследования. В Медвежинском желобе, в низине между Шпицбергенской банкой и банкой Персея, а также на восточном склоне банки Персея в сторону центрального бассейна. Максимальная плотность поселения губок величиной 3-7 тыс. экз./км² была обнаружена в юго-западной части района исследования акватории Баренцева моря и вблизи Земли Короля Карла. Минимальная плотность численности губок (менее 1 тыс. экз./км²) определена в районах Медвежинского желоба, на юго-западной части банки Персея, так же на западном и восточном склонах Банки Персея. Самые высокие показатели биомассы (более 4 кг/км², до 4,6 кг/км²) были определены на шельфе к северу от побережья Норвегии, а самые низкие (менее 0,1 кг/км², до 0,01 кг/км²) – в районе восточного склона Шпицбергенской банки, а так же в районе северного склона банки Персея. Самыми распространенными видами губок по всей акватории исследований явились: *Semisuberites cribrosa*, *Mycale lingua*, *Thenaea valdiviae*, *Polymastia thielei*. Самыми редкими оказались виды: *Tethya norvegica*, *Axinella hispida*, *Suberites ficus*, *Haliclona aqueductus*, *Muxilla incrustans*, *Haliclona gracilis*, *Crella pyrula*. Наиболее распространенным видом стал *Semisuberites cribrosa*, встреченный на 3 станциях, где его средняя плотность поселения составила 2500 экз./км².

Впервые для Баренцева моря нами было установлено 6 видов. *Suberites ficus*, *Suberites carnosus*, *Hemigellius porosus*, *Haliclona aqueductus*, *Homaxinella subdola*, *Polymastia penicillus*.

Научный руководитель – Р. М. Сабиров, канд. биол. наук, доцент.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЗАЧАТКА ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ ТРЕМАТОД (*NEODERMATA:* *TREMATODA*)

Организация генеративного материала мирацидиев изучена достаточно подробно. В то же время, приводимые в литературе описания строения зачатка половой системы (ЗПС) церкарий, равно как и дифференцировки составляющих его элементов, фрагментарны и неполны. Для выявления закономерностей формирования ЗПС мы приводим обобщенные данные о процессах их дифференцировки в онтогенезе гермафродитного поколения трематод.

Материалом послужили редии *Neophasis lageniformis*, спороцисты *Brachylaima* sp. и *Cercaria etgesii*. По литературным данным приведен анализ формирования ЗПС у таксонов Strigeidae, Heterophyidae, Pronoccephalidae, Opescoelidae, Microphallidae, Lecithodendriidae, Plagiorchiidae, Allocreadiidae, Phylophthalmidae и Echinostomatidae.

Группа клеток, формирующая ЗПС, обособляется на ранних этапах эмбриогенеза. У личинок ряда групп (Strigeidae, Heterophyidae) морфогенез зачатка на этом останавливается. В результате ЗПС сформированных церкарий стригеид и гетерофиид представлен компактной группой недифференцированных клеток, расположенных в заднем отделе тела.

В ряде случаев ЗПС сформированных церкарий принимает лопастную форму. Одна из лопастей является зачатком мужской половой системы, другая — женской. Подобная организация ЗПС обнаруживается у личинок из таксонов Pleurogenidae (*C. etgesii*), Lecithodendriidae (*Mosesia chordeilesia*) и Echinostomatidae

(*Euclinostomum heterostomum*). При этом клетки, составляющие отдельные лопасти ЗПС, являются слабо дифференцированными.

В случае еще одного варианта дифференцировки ЗПС в лопастях появляются более крупные клетки со светлым ядром и выраженным ядрышком. Описанной организацией обладает ЗПС сформированных церкарий *Brachylaima* sp. (Brachylaimidae).

В ряде случаев продолжается дифференциация «мужской» лопасти ЗПС — обнаруживаются зачатки семенников, семявыносящих канальцев и семяпровода. При этом «женская» лопасть остается не подразделенной на зачатки отдельных органов. Подобным образом устроен ЗПС как сформированных церкарий ряда видов Plagiorchiidae (*Paralepoderma cloacicola*), так и развивающихся эмбрионов церкарий *N. lageniformis* (Acanthocolpidae).

Последующая дифференцировка ЗПС характерна для сформированных церкарий ряда видов Pronoccephalidae (*Macravestibulum eversum*), Opescoelidae (*Plagioporus sinitsini*), Microphallidae (*Microphallus pirum*) и Acanthocolpidae (*N. lageniformis*). «Женская» лопасть ЗПС этих личинок состоит из зачатка яичника, яйцевода и матки.

У мирацидиев разных видов генеративный материал может быть представлен либо единственной материнской редией (Allocreadiidae, Phylolphthalmidae), либо несколькими генеративными клетками и развивающимися эмбрионами (Fasciolidae). В то же время существуют личинки, обладающие настоящей герминальной массой (Echinostomatidae) или исключительно генеративными и недифференцированными клетками (Strigeidae, Plagiorchiidae, Heterophyidae). Изменение скорости развития репродуктивных элементов относительно соматических (гетерохрония) является общей эволюционной тенденцией, характерной для личинок материнского партеногенетического и гермафродитного поколений.

Научный руководитель — А.А. Добровольский, канд. биол. наук, доцент.

ЭКОСИСТЕМА ЧЕЛОВЕК-ДЕЛЬФИН В АКВАТОРИИ ЧЕРНОГО МОРЯ

Несмотря на подписанную в 1974 году международную Конвенцию о запрещении промышленного отлова дельфинов, популяция черноморских афалин продолжает уменьшаться. Черноморские дельфины (*Tursiops truncatus*), дышащие легкими афалины гибнут чаще всего, попадая в рыболовецкие сети, запутываются в них и погибают из-за невозможности всплыть для вдоха. Главной причиной гибели дельфинов является загрязнение моря продуктами жизнедеятельности человека. Кроме этого, наличие прибрежной акватории моря патогенных микроорганизмов приводит к заражению животных инфекционными заболеваниями и гибели больных особей.

Мы провели анкетирование рыбаков с информацией о присутствии дельфинов в изученной акватории моря. В результате обработанных анкет, со слов респондентов было зафиксировано ~300 особей афалин. В среднем в поле зрения они находились от 5 до 10 минут, вели себя игриво и дружелюбно. Согласно анкетным данным выявлен случай запутывания дельфина в рыболовецких сетях в июле текущего 2017 года. Были попытки спасти дельфина, но безрезультатно. 18 июля недалеко от городских пляжей Евпатории был замечен дельфин. Он очень медленно передвигался вдоль берега. С помощью людей его удалось отбуксировать в глубокую часть прибрежной акватории, и дельфин уплыл в море.

Таким образом, наши исследования показали, что в летнее время дельфины довольно часто посещают прибрежную зону в г.Евпатория.

Процесс адаптации диких дельфинов связан с огромными психологическими нагрузками, обусловленными резкими изменениями условий обитания, воздействием окружающей среды, активацией в неволе факторов риска, приводящие к перестройке ряда жизненно-важных функциональных систем. Для таких животных этот период является карантинным. Правильное оборудование мест содержания дельфинов является одним из важных условий сохранения здоровья и обеспечения их нормальной жизнедеятельности в неволе. В настоящее время плененные дельфины широко применяются в цирковом искусстве, а также на службе военных ведомств и охранных предприятий. Но это далеко не предел профессиональных возможностей черноморских дельфинов афалин. Несмотря на успехи современной неврологии, существуют заболевания, плохо поддающиеся лечению с помощью традиционных медикаментозных средств и методов. К ним относятся СХУ, неврологические нарушения у людей, детские неврозы, аутизм и ДЦП. Для лечения указанных заболеваний необходимы принципиально новые подходы и методики. Одним из таких методов может стать дельфинотерапия. При дельфинотерапии главными объектами лечебного и профилактического воздействия могут стать ключевые факторы патогенеза нервных заболеваний, плохо поддающихся другим методам лечения. Сонарное ультразвуковое воздействие дельфина, в комплексе с другими физическими факторами, связанные с морскими купаниями, активизирует поведение больного, формирует у него положительный эмоциональный настрой, мобилизует резервы его организма, что, в свою очередь является благоприятным фоном для последующих лечебно-реабилитационных мероприятий.

Научные руководители – д-р. биол. наук И.Ю.Никитин; д-р мед. наук Л.Н.Лукина

УДК 574.3, 599.735.51, 343.77

О. А. Трофимцев, Я. Я. Тыньо

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина*

gedsirk@gmail.com

ОСОБО ОХРАНЯЕМЫЕ ПРИРОДНЫЕ ТЕРРИТОРИИ КАК ФАКТОР СОХРАНЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ ЗУБРОВ

Зубр с древнейших времён являлся объектом охотничьего промысла человека. Однако, ввиду своих физиологических особенностей и чрезмерного отстрела, данный вид стал находиться под угрозой, что привело к включению его в Красную книгу, и, соответственно, взятию под охрану. Но несмотря на предпринятые меры, Великая Октябрьская революция поменяла планы царского режима на защиту оставшихся зубров, и уже в 1920 г. было убито последнее животное вольной Беловежской популяции, а в 1927 г. – Кавказской, причём действовавший на тот момент УК РСФСР 1926 г. позволил уйти от строгой ответственности виновным, т.к. максимальное наказание по данному составу преступления составляло один год лишения свободы.

Сложившийся кризис показал высокую степень уязвимости крупнейшего парнокопытного Европы. По оценке Международного общества по сохранению зубров в 1927 г. в мире осталось всего 48 представителей вида. В результате была начата работа по искусственному восстановлению численности путём скрещивания оставшихся животных между собой, по большей части применявшегося для восстановления беловежского зубра, и поглотительного скрещивания с американскими бизонами, возобновлявшего популяцию кавказского зубра.

Проведённая работа позволила существенно увеличить популяцию в неволе, и уже к концу 1940 г. были предприняты попытки содержания зубров вольными популяциями, в т.ч. и на территории СССР, преимущественно в Беловежской пуще и Аскании-Нова, а также в

Кавказском заповеднике. Практически не повлияла на воссоздание вида тяжёлая ситуация с охраной природы в Советском Союзе, продолжавшаяся до 1962 г., которая провозглашалась «Комсомольской правдой» следующим образом: «Весь вопрос в том, для какой цели служат эти охранные мероприятия – для «охраны природы» ради природы или для того, чтобы максимально заставить природу служить задаче построения нового, коммунистического общества», – были созданы специальные питомники, в которых продолжалась селекционная работа, которая позволила увеличить численность зубра в СССР до 280 голов в 1958 г.

Особо охраняемые природные территории позволили содержать большие стада животных за счёт наличия практически неограниченной площади, в частности в рамках прежних ареалов, по сравнению с разведением в неволе. Предпринятые меры привели к дальнейшему увеличению поголовья, которое к 1980 г. составляло 1100 животных на территории СССР. После распада Советского Союза республиками была продолжена планомерная работа сохранения вида. Уникальным является опыт Полесского заповедника, в который в 1996 г. было завезено 16 особей, а на настоящий момент популяция насчитывает 145 особей. В Российской Федерации судьба зубра сложилась иначе: в 90-х гг. было отмечено снижение численности в Кавказском заповеднике.

В настоящее время исчезновение зубру практически не угрожает, его численность достигла 6000 особей, был компенсирован кризис Кавказского заповедника, вид был интродуцирован в Якутию. Данные факты позволяют говорить о том, что ООПТ как являлись, так и являются важным фактором поддержания численности зубра. На данный момент опасения вызывает только растущий уровень браконьерства – за 2016 г. по ст. 258.1 УК РФ (Незаконные добыча <...> диких животных <...> принадлежащих к видам, занесённым в Красную книгу РФ <...>) было осуждено более 500 человек.

Научный руководитель: Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук., доцент.

УДК 574.524

Е. П. Щапова, А. Н. Гурков, Е. В. Борвинская, И. А. Белоусова,
И. В. Меглинский, М. А. Тимофеев
Иркутский государственный университет
shchapova.katerina@gmail.com

МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ АМФИПОД IN VIVO

Озеро Байкал — это крупнейший в мире резервуар чистой питьевой воды с чувствительной экосистемой, чьи эндемичные обитатели приспособлены к относительно узкому спектру условий среды. Наиболее разнообразная таксономическая группа Байкала — это амфиподы (Amphipoda, Crustacea), к которым относится более 350 эндемичных видов и подвидов.

В последние годы мониторинг состояния экосистемы Байкала имеет особое значение в свете сообщений о сезонном развитии непрямой эвтрофикации отдельных участков его прибрежной зоны и влияния глобального изменения климата. В данной ситуации актуальными становятся исследования, направленные на разработку новых более эффективных методов экологического мониторинга, и, в частности, методов отслеживания физиологического состояния обитателей озера.

Совместить исследование физиологических показателей внутренней среды организма с длительной прижизненной оценкой состояния животного, имеющего небольшие размеры, могут имплантируемые оптические микросенсоры, среди которых особый интерес представляют микроинкапсулированные флуоресцентные сенсоры (МФС). На сегодняшний день разработано большое разнообразие флуоресцентных красителей, чувствительных к таким показателям как pH, содержание некоторых метаболитов и ионов. Все эти сенсоры изменяют спектр или интенсивность флуоресценции при

изменении соответствующего параметра. Инкапсуляция данных красителей в полупроницаемые оболочки позволяет нивелировать возможную токсичность красителя для организма, а также существенно усиливать оптический сигнал сенсора, находящегося внутри живого организма.

В данной работе разработан метод многократных измерений рН гемолимфы амфипод у одной и той же особи с помощью имплантируемого инкапсулированного рН-чувствительного сенсора SNARF-1. В качестве объекта исследования был выбран байкальский эндемичный вид амфипод, обитатель верхнего и нижнего отдела литорали озера Байкал *Eulimnogammarus verrucosus*. Предварительно, для проверки ответной реакции организма амфипод на инъекцию МФС были исследованы маркеры неспецифического стресс-ответа, такие как ферменты антиоксидантной системы (пероксидаза, каталаза и глутатион-S-трансфераза) и БТШ70. Показано, что инъекции МФС не вызывают изменений в уровнях маркеров неспецифического стресс-ответа у амфипод *E. verrucosus*.

Измеренные с помощью МФС средние значения рН гемолимфы *E. verrucosus* в условиях акклимации согласуются с данными, полученными с помощью рН-метра с микроэлектродом, и составляли 8,2. В условиях гипоксических экспозиций (повышенный уровень CO₂; пониженное содержание O₂) зафиксировано статистически значимое снижение среднего рН гемолимфы до уровня 7,7, что показывает применимость рН-чувствительных МФС для оценки физиологического состояния амфипод в стрессовых условиях.

Полученные результаты открывают широкие перспективы дальнейшего развития данной технологии для её применения в экофизиологических и экотоксикологических исследованиях.

Работа проведена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 15-14-10008 и РФФИ № 15-29-01003.

Научный руководитель – М.А. Тимофеев, проф., д-р биол. наук.

Ю.А. Яковлева, Н.А. Лебедева, Е.С. Насонова, Е.В. Сабанеева
Санкт-Петербургский государственный университет
st041958@student.spbu.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ВИДА МИКРОСПОРИДИИ ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ ИНFUЗОРИИ *PARAMESCIUM AURELIA*

Протисты нередко выступают в качестве хозяев различных микроорганизмов, как прокариот, так и эукариот. В подобных симбиотических системах взаимоотношения между партнерами могут варьировать от паразитизма до мутуализма. Микроспоридии являются облигатными внутриклеточными паразитами представителей разных систематических групп эукариот, однако у инфузорий было зарегистрировано всего несколько случаев подобных инфекций. Для широко распространенного рода *Paramecium* заражение микроспоридиями до недавнего времени обнаружено не было.

Клон SPM5-3 (комплекс видов *P. aurelia*) был выделен из природной популяции в Испании в 2015 году. В цитоплазме парамеций были обнаружены микроорганизмы размером около 5 мкм характерной сферической формы. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с универсальным эубактериальным зондом дала негативный результат, однако при окрашивании клеток DAPI было выявлено большое количество ядер, принадлежавших эндосимбионтам. На электронных микрофотографиях эндосимбионты демонстрируют признаки микроспоридий: сферические споры имеют электронно-плотный экзоспор и электронно-светлый эндоспор, якорный диск, короткую изофилярную полярную трубку и гранулярный полярный пласт, состоящий из двух частей. Споры одноядерные, полярная трубка образует один виток. В цитоплазме

инфицированных инфузорий присутствовали и другие стадии жизненного цикла.

Меронты представляют собой одноядерные клетки неправильной формы с недифференцированной цитоплазмой и множеством свободных рибосом. При переходе от мерогонии к спорогонии на поверхности плазматической мембраны появляются электронно-плотные утолщения. Споронты содержат одно ядро, многочисленные рибосомы и участки формирующегося экзоспора на поверхности плазматической мембраны. Спорогониальный плазмодий имеет четыре лопасти, каждая из которых содержит по одному ядру. Образовавшиеся в результате деления споробласты имеют хорошо развитый эндоплазматический ретикулум с многочисленными рибосомами, формирующуюся полярную трубку, а также якорный диск и зачатки полярнопласта.

Результаты секвенирования 18S рДНК подтвердили ультраструктурные данные, свидетельствующие о принадлежности эндосимбионта к группе *Microsporidia* (IV клада) и его близости к ранее описанному виду *Euplothespora binucleata*, паразиту инфузории *Euplothes woodruffi*.

В экспериментальном заражении только 3 из 8 протестированных клонов *P. aurelia* были инфицированы, что наводит на мысль о видоспецифичности заражения. Планируется определение видовой принадлежности протестированных клонов по последовательности митохондриального гена COXI.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-06410) с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ: «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Центр микроскопии и микроанализа» и «Культивирование микроорганизмов».

Научный руководитель – Е.В. Сабанеева, канд. биол. наук, доцент.

УДК 575.224.4

Е.А. Алексеева, Т.А. Евстюхина, Т.Н. Кожина, В.Т. Пешехонов

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.

Константинова Национального исследовательского центра

«Курчатовский институт», г. Гатчина

helen.elena1204@gmail.com

РОЛЬ ГЕНА *HIM1* В РЕГУЛЯЦИИ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ген *HIM1* (*high induced mutagenesis*) кодирует белок *Him1p*, биохимическая функция этого белка не известна. Известно, что выключение гена *HIM1* приводит к увеличению как спонтанного, так и индуцированного мутагенеза. Так же известно, что белок *Him1p* физически взаимодействует с гистон деацетилазой *Sin3*, образуя *SIN3* деацетилазный комплекс.

Sin3 участвует в таких процессах как: мейоз, репликация и репарация ДНК, регуляция транскрипции, а также вовлечен в процесс модификации структуры хроматина.

Для определения роли гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мы определили уровень спонтанного репаративного и репликативного мутагенеза у штаммов дикого типа (ДТ), одиночных мутантов *sin3* и *him1*, двойного мутанта *sin3him1*. А также выживаемость и уровень УФ-индуцированного мутагенеза у этих же штаммов и штаммов *radh* и *tph1*, двойных мутантов *him1radh* и *tph1him1*.

Благодаря, полученным результатам мы пришли к следующим выводам:

- 1) *him1* эпистатирует в спонтанных мутациях над *sin3*;
- 2) Показали, что мутация *sin3* значительно снижает *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез;

3) Показали, что *Him1p* взаимодействует с гистон деацетилазой *Sin3* на генетическом и биохимическом уровне, при этом *Him1p* не является субъединицей *SIN3* деацетилазного комплекса;

4) *radh* эпистатирует в УФ-индуцированных мутациях над *him1*;

5) мутация *him1* уменьшает частоту УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *mph1him1* по сравнению с одиночным мутантом *mph1*.

Научный руководитель – В.Г. Королев, д-р биол. наук.

УДК 57.088.3

А. Ф. Ахметгалиева, В. В. Ульянова
Казанский федеральный университет
akhmetgalievaa@bk.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БАРСТАРА С ГИСТИДИНОВОЙ МЕТКОЙ НА N-ТЕРМИНАЛЬНОМ КОНЦЕ

Ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот, привлекают внимание исследователей в связи с их важной ролью в жизни организмов и практической значимостью для человека. Рибонуклеазы (РНКазы) обладают множеством полезных с медицинской точки зрения свойств, одними из которых являются избирательная противоопухолевая и противовирусная активности. Поскольку для многих РНКаз известны белки-ингибиторы, можно сделать вывод о том, что и они играют значимую роль в вышеуказанных процессах. Обнаружение ингибиторов РНКаз и изучение их свойств является актуальной проблемой, так как непосредственно от них зависит функционирование РНКаз. Целью данной работы стало получение гомогенного препарата ингибитора низкомолекулярной гуанилпредпочитающей РНКазы *Bacillus amyloliquefaciens* – барстара, несущего на N-терминальном конце полигистидиновую метку.

На первом этапе ген ингибитора был амплифицирован с помощью ПЦР и клонирован на экспрессионной плазмиде pET15b в клетках *Escherichia coli* JM109. Наличие гена в рекомбинантных клонах подтверждали методом ПЦР с колоний, с помощью рестрикционного анализа плазмид и секвенирования по Сэнгеру плазмидного участка T7. Сконструированную плазмиду внедряли в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 λ DE3, индукцию синтеза целевого белка проводили при внесении ИПТГ в бактериальную культуру, находящуюся в логарифмической фазе роста. В результате было установлено, что все рекомбинантные клоны экспрессировали белок с молекулярным весом около 12 кДа при ИПТГ-индукции. Для оптимизации экспрессии гена барстара проводили подбор условий индукции (температура – 30°C и 37°C, время – от 2 до 16 ч, концентрация ИПТГ – от 0.1 до 1 мМ) и выделения белка с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на никель-сефарозе (варьировали состав буферов для связывания белка с сорбентом, удаления примесных и несвязавшихся белков и элюции). С помощью ПААГ-ДСН электрофореза было показано присутствие двух белков размером около 12 кДа и 25 кДа в элюате. С помощью рехроматографии в денатурирующих условиях, а также масс-спектрометрии было показано, что оба белка представляют собой мономерную и димерную формы барстара, соответственно. В результате был получен препарат барстара в количестве 20 мг.

Таким образом, в ходе работы был получен рекомбинантный ингибитор РНКазы *B. amyloliquefaciens*, который будет использован в дальнейшем для изучения его димеризации, а также активности по отношению к рибонуклеазам различного происхождения.

УДК 571.27

Е. В. Важдаева, Е. В. Большакова, Е. В. Мохонов,

Е. А. Василенко, И. В. Астраханцева

Университет Лобачевского, г. Н.Новгород

kate.murom@yandex.ru

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ СВЯЗЫВАТЬ ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛИ НА ПОВЕРХНОСТИ МАКРОФАГОВ

Фактор некроза опухоли (TNF) – многофункциональный провоспалительный цитокин. На сегодняшний день известно, что чрезмерная продукция TNF является одним из ключевых факторов, оказывающих влияние на развитие хронических аутоиммунных заболеваний. При этом известно, что TNF играет важную роль в защите организма от патогенов и участвует в развитии иммунного ответа, поэтому целесообразным считается подход в терапии аутоиммунных заболеваний, суть которого состоит в направленной блокировке биологической активности TNF только из определенных клеточных источников. Для оценки эффективности такого подхода могут быть использованы новые агенты для тераностики, которые, благодаря наличию в своем составе флуоресцентного сенсора и блокирующего макрофагальный TNF наноантитела, способны не только эффективно связывать этот цитокин на поверхности клетки, но и позволят визуализировать его в процессе развития патологии.

В нашей лаборатории были созданы биспецифические флуоресцентные белки: BV1-Kat, BV1C-Kat, BV1mut-Kat. BV1-Kat представляет собой связанный с флуоресцентным белком Katushka многофункциональный агент на основе наноантител верблюда (VHH), способный связывать молекулу F4/80 на поверхности макрофагов и нейтрализовать TNF. BV1C-Kat и BV1mut-Kat являются контрольными белками: они не способны связываться с молекулой F4/80, при этом также могут блокировать TNF.

Целью настоящей работы явилось исследование функциональной эффективности этих белков, а именно, определение их способности связывать TNF на поверхности макрофагов *in vitro*.

Для исследования функциональных свойств белков использовали костномозговые макрофаги. Для этого из бедренных костей гуманизированных по гену TNF мышей выделяли клетки костного мозга и культивировали в течение 10 дней в среде, содержащей макрофагальный колониестимулирующий фактор. Для оценки активности белков выделенные макрофаги инкубировали с флуоресцентными биспецифическими белками 30 минут, затем добавляли LPS (100 нг/мл) для их активации и через 4 часа инкубации собирали супернатант, в котором методом иммуноферментного анализа оценивали количество TNF с помощью коммерческого набора (4298657, eBioscience) по протоколу производителя. *Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок BV1-Kat обладает блокирующим эффектом и снижает количество TNF в супернатанте по сравнению с контрольными белками BV1C-Kat, BV1-mut-Kat.*

Для проверки способности биспецифических флуоресцентных белков связывать макрофагальный TNF методом проточной цитофлуориметрии макрофаги инкубировали с белками 30 минут, затем анализировали на проточном цитометре Cytotflex S (Beckman Coulter, США). Результаты показали, что белки BV1-Kat, BV1C-Kat, BV1mut-Kat способны связываться с макрофагами, однако наиболее высокий уровень флуоресцентного сигнала наблюдался для макрофагов, проинкубированных с белком BV1-Kat.

Таким образом, в отличие от контрольных белков, BV1-Kat способен связываться с макрофагами и блокировать TNF, и, поэтому, является перспективным агентом для терапии.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №16-34-00561, №17-04-01478) и в рамках государственного задания (шифр проекта 20.6159.2017/П220).

Научные руководители – Д. В. Новиков – канд. биол. наук, доцент, Е. Н. Горшкова – канд. биол. наук.

УДК 577.2; 57.022

Е. В. Валеева^{1,2}, Э. С. Егорова²

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Казанский государственный медицинский университет*

vevaleeva@ya.ru

ВЛИЯНИЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ СПОРТИВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕРНЫХ УЧАСТКОВ

Теломеры – концевые участки ДНК, вариабельность длины которых во многом зависит от внешних факторов и внутренних процессов организма человека. Предполагается, что занятия спортом могут оказать положительное влияние на относительную длину теломер человека. Поскольку в каждом виде спорта имеется своя специфика, то исследуемым объектом данной работы выбрана относительная длина теломер высококвалифицированных спортсменов.

Целью данного исследования явилось оценка влияния физической активности на относительную длину теломерных участков у профессиональных спортсменов.

В исследовании приняли участие 914 российских спортсменов (28% женщин, средний возраст $20,7 \pm 8,4$ года; скоростно-силовые виды спорта ($n=274$), виды спорта на выносливость ($n=58$), единоборства ($n=108$), виды спорта на средние дистанции ($n=186$) и виды спорта со смешанным проявлением физических качеств ($n=295$)) и 689 здоровых, физически умеренно активных лиц (62% женщин, $20,8 \pm 16,5$ лет). За среднюю длину теломер брали значение соотношение количества ДНК с теломерной последовательности к однокопийному участку геномной ДНК, используя количественную ПЦР в реальном времени.

В среднем длина теломер всех спортсменов составляла $1,187 \pm 0,098$ против $1,177 \pm 0,132$ контроля ($p=0,1$). Разделив на 4 возрастные категории (первая группа – 8-11 лет, вторая – 12-20 лет, третья – 21-45 лет, четвертая – 46-77 лет), обнаружены более высокие показатели относительной длины теломер во второй ($p < 0,0001$) и в третьей группе ($p=0,03$) у спортсменов по сравнению с контролем. В ходе анализа по видам спорта выявлено, что самые длинные теломеры у спортсменов скоростно-силовых видов спорта ($1,197 \pm 0,102$), далее у единоборцев

(1,192±0,094), у средневигов (1,964±0,086), спортсменов на выносливость (1,177±0,118) и меньшая длина у представителей видов спорта со смешанным проявлением физических качеств (1,172±0,101). Корреляционный анализ показал, что с ростом спортивной квалификации увеличиваются длины теломер спортсменов ($p < 0,0001$, $r = 0,15$; ЗМС (n=3) - 1,225±0,075, МСМК+МС (n=184) - 1,206±0,095, КМС (n=263) - 1,192±0,101, с разрядом (n=174) - 1,192±0,098, без разряда (n=310) - 1,169±0,094).

Полученные нами данные показывают, что у профессиональных спортсменов наблюдается максимальное значение относительной длины теломер в возрасте от 12 до 45 лет. Для спортсменов, специализирующихся в видах спорта, связанных с выносливостью и скоростно-силовых видах спорта, выявлена значительно бóльшая относительная длина теломер по сравнению с индивидами, занимающихся другими видами спорта. И с ростом спортивной квалификации, показатель относительной длины теломер имеет тенденцию к увеличению: относительная длина теломер максимальна у заслуженных мастеров спорта, минимальна - у спортсменов без разряда.

Научные руководители – О. А. Кравцова, канд. биол. наук, доцент; И. И. Ахметов, д-р мед. наук.

УДК 577.29

М.Е. Велижанина¹, Т.А. Рыжова^{1,2}, Ю.В. Сопова^{1,2}, А.А. Шенфельд^{1,2}, А.П. Галкин^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

² Санкт-Петербургский филиал института общей генетики РАН
velizhanina.me@gmail.com

FXR1 – ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АМИЛОИД В МОЗГЕ КРЫСЫ *RATTUS NORVEGICUS*

Амилоиды - это белковые полимеры, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных бета-слоев. Первоначальный интерес в изучении данного феномена был связан с тем, что амилоидные фибриллы и олигомеры ряда белков

ассоциированы с серьезными заболеваниями человека и млекопитающих, в том числе с болезнями Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона. Наряду с патологическими амилоидами, известны функциональные, участвующие в регуляции важных биологических процессов.

В нашей лаборатории разработан и апробирован метод PSIA-LC-MALDI, основанный на общем биохимическом свойстве амилоидов - их повышенной устойчивости к обработке детергентами, такими как SDS. Данный метод направлен на выделение и идентификацию амилоидов в протеоме различных организмов.

Мы провели поиск высокомолекулярных SDS-устойчивых агрегатов в мозге молодых самцов крысы *Rattus norvegicus*. Среди прочих белков, выявленных с помощью PSIA-LC-MALDI, особое внимание в качестве кандидата в функциональные амилоиды привлек к себе белок FXR1. Это РНК-связывающий белок, участвующий в контроле долговременной памяти и психоэмоционального состояния.

С помощью вестерн-блот гибридизации с антителами, специфичными к FXR1, мы подтвердили наличие в мозге молодых крыс высокомолекулярных агрегатов белка FXR1, устойчивых к обработке SDS. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности данного белка выявил потенциально амилоидогенный участок в N-концевом фрагменте (1-380 а.к.).

Амилоидные свойства белка FXR1(1-380) были охарактеризованы с помощью бактериальной системы C-DAG. Эта система позволяет идентифицировать гетерологичные белки, способные формировать амилоидные фибриллы *in vivo* при продукции в клетках *E. coli* и экскреции в межклеточное пространство. Мы показали, что белок FXR1(1-380) при продукции в системе C-DAG формирует фибриллы, которые связываются с амилоид-специфичным красителем «Congo Red» и демонстрируют двойное лучепреломление в поляризованном свете. С помощью электронной микроскопии мы подтвердили наличие амилоидных фибрилл в анализируемом образце.

Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать, что белок FXR1 является функциональным амилоидом в мозге крысы *Rattus norvegicus*.

Научный руководитель – Ю. В. Сопова, к. б. н.

УДК 616-01/09

Д.З. Гатина, И.И.Салафутдинов, Е.Е. Гаранина, Е.В.Мартынова
Институт Фундаментальной Медицины и Биологии КФУ,
sal.ilnur@gmail.com

АНАЛИЗ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ, ХЕМОКИНОВ И ФАКТОРОВ РОСТА МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ИЗ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

До сих пор большинство клеток, используемых в клеточной терапии, были мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) из различных источников. Мононуклеарные клетки (МНК) из пуповинной или периферической крови могут стать альтернативным вариантом для трансплантации, поскольку МНК, содержат как гемопоэтические стволовые клетки, так и МСК. Кроме этого, другие типы клеток, присутствующие во фракции МНК, могут играть важную роль в регенерации тканей.

В данной работе из пуповинной фракции человека были выделены мононуклеарные клетки, которые в дальнейшем анализировались с помощью проточной цитометрии и мультиплексного анализа по технологии Luminex®xMAP.

Для выявления различных субпопуляций гемопоэтических клеток выделенные мононуклеарные клетки из пуповинной крови человека (МККП) предварительно окрашивались моноклональными антителами, специфичными к поверхностным белкам CD45, CD3, CD14, CD34, CD38, CD90. Согласно данным, полученным с помощью проточной цитофлуориметрии, среди мононуклеарных клеток пуповинной крови CD45+ лимфоциты составляют 58,9% всей

популяции. Среди лимфоцитов Т-лимфоциты (иммунофенотип CD45+CD3+) составляют 59,2%. Среди всей популяции мононуклеарных клеток из пуповинной крови человека, моноциты составляют 7,3% (иммунофенотип CD14+). Данное процентное распределение основных популяций клеток крови (лимфоциты, Т-лимфоциты, моноциты) является нормальным соотношением для мононуклеарных клеток выделяемых из пуповинной крови человека.

Далее для оценки дифференцировочного потенциала культивируемых клеток был проведен тест колониеобразования, который показал формирование различных колоний гематопозитического типа культивируемыми МККП. В частности, были выявлены колонии имеющие морфологию эритроидного типа, гранулоцитарного типа, макрофогального типа, гранулоцит-макрофогального типа и эритроидные бляшко-образующего типа.

Так же для оценки паракринных и аутокринных возможностей МППК, мы провели мультиплексный анализ 48 факторов с помощью технологии Luminex®xMAP. Мультиплексный анализ выявил секрецию цитокинов провоспалительного (IL-8, IL-6, IL-12p40, IL-2, IL-3, IL-15, IL-17, GM-CSF, TNF- α , TNF- β , TRAIL, IFN-gamma, IL-2Ra, IL-1a) и противовоспалительного (IL-1ra) характера, хемокинов (IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 β , MIP-1 α , RANTES, CTACK, GRO- α , Eotaxin, MIG, TRAIL, IL-16, IL-18) и факторов роста (G-CSF, SDF-1 α , VEGF, HGF, LIF, MIF, SDCF- β , FGF, M-CSF, PDGF-bb, SCF) мононуклеарными клетками. МККП отличались более активной секрецией IL-8, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1 β , CTACK, GRO α , MIG, MIF, SCGF- β .

Следовательно МППК так же могут иметь терапевтический эффект, за счёт секреции факторов, вовлеченных в различные восстановительные процессы.

Научный руководитель – И.И. Салафутдинов, канд. биол. наук

УДК 577.29

Е. А. Голубицкая^{1,2,*}, О. А. Чинак¹, О. А. Коваль^{1,2},

И. А. Пышная¹, В. А. Рихтер¹

*1. Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, г. Новосибирск*

*2. Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

sennuie@gmail.com

БЕЛОК МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА ЛАКТАПТИН СПОСОБЕН ДОСТАВЛЯТЬ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ

Лактаптин, фрагмент к-казеина молока человека, и его рекомбинантный аналог RL2 обладают цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам млекопитающих *in vitro*. Основываясь на данных о первичной структуре и механизме проникновения RL2 в клетки, этот пептид может быть отнесён к пептидам класса CPP (Cell-penetrating peptides), известным своей способностью проникать через плазматическую мембрану живых клеток и доставлять связанные с ними молекулы в цитоплазму или ядро клеток. Пептиды CPP успешно используют для доставки терапевтически значимых молекул или препаратов, например, наночастиц, липосом, мицелл, белков, антибиотиков и нуклеиновых кислот, как в виде нековалентных, так и ковалентных комплексов.

Целью данной работы было изучение способности RL2 доставлять нуклеиновые кислоты в составе нековалентных комплексов в клетки человека на примере плазмидной ДНК pEGFP-N1, экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок EGFP. Методом ретардации в агарозном геле определено соотношение, при котором происходит связывание пептида с плазмидной ДНК. Размеры комплексов и их суммарный поверхностный заряд были охарактеризованы методом динамического светорассеяния. На основании полученных данных были подобраны условия формирования нековалентных комплексов RL2:pEGFP.

Доставку нуклеиновых кислот в клетки с помощью RL2 анализировали на модели аденокарциномы легкого A549 методом флуоресцентной микроскопии, оценивая количество клеток, продуцирующих белок EGFP. Мы обнаружили, что эффективное проникновение комплексов RL2:pEGFP наблюдается при мольных соотношениях $RL2:pEGFP \geq 2800:1$. В совокупности данные о поверхностном заряде и об эффективности трансформации клеток комплексами RL2:pEGFP с различными мольными соотношениями компонентов позволяют заключить, что эффективность трансформации клеток пропорциональна поверхностному заряду комплексов.

Научные руководители – О. А. Коваль, канд. биол. наук, И. А. Пышная, канд. хим. наук.

УДК 578.53:578.82:578.83:619.616

Я. Я. Тыньо, М. А. Данилова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина
yytynio@mail.ru

МОДИФИКАЦИЯ ДНК-ВАКЦИН: МЕТОДЫ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССИНГА И ПРЕЗЕНТАЦИИ ВИРУСНОГО АНТИГЕНА

Существует несколько способов изменения процессинга и презентации вирусного антигена. Они основываются прежде всего на перенаправлении антигена путем добавления специализированных сигнальных последовательностей, способствующих узнаванию антигена.

Цель работы — исследовать возможные методы изменения процессинга и презентации вирусного антигена за счет введения специализированных сигнальных последовательностей и выявить наиболее эффективные способы модификации ДНК-вакцин.

Была осуществлена сравнительная оценка подходов направленной регуляции иммунного ответа на антигены, которые могут быть

использованы для повышения эффективности ДНК-вакцин для профилактики или терапии различных вирусных заболеваний.

Для изменения процессинга и презентации вирусного антигена могут быть предложены различные варианты решения, которые позволяют направить антиген:

- на протеасомную деградацию благодаря добавлению белков или их фрагментов, которые напрямую связываются с органеллой; что способствует усилению презентации антигена в составе с МНС-I и активации CD8+ Т-лимфоцитов, т.е. к усилению клеточного иммунного ответа.

- на лизосомную деградацию с помощью сигналов белкового сортирования, что усиливает процессинг в МНС-II и активирует CD4+ Т-клетки, что ведет к стимуляции клеточного (Th1-типа) и гуморального (Th2-типа) иммунного ответов.

- к специализированным АПК для представления секретлируемого трансфицированными клетками вакцинного антигена по пути кросс-презентации в составе МНС-I за счет слияния антигена с различными лигандами (CD40L, Flt-3L, CTLA4), рецепторы которых находятся на поверхности дендритных клеток.

Многолетние разработки ДНК-вакцин показали, что добиться продукции антител только за счет синтеза вирусных белков достаточно сложно. Для получения гуморального иммунного ответа необходимо повысить эффективность презентации кодируемых ДНК-вакциной антигенов через МНС-II, например, путем направления чужеродных белков в лизосомы, так как взаимодействие антигенов с МНС-II происходит в лизосомальных компартментах клетки.

Таким образом, были изучены различные методы изменения процессинга и презентации вирусного антигена за счет введения специализированных сигнальных последовательностей. Запуск гуморального иммунного ответа обеспечивается взаимодействием Т-лимфоцитов с молекулами МНС-II, содержащими фрагменты чужеродных белков. В связи с этим, наиболее эффективным способом модификации ДНК-вакцин можно считать способ направления антигена на деградацию в лизосомы.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 576.53, 576.364

Я.В. Евстратова^{1,2}, М.И. Кобякова^{1,2}, Р.С. Фадеев^{1,2}

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
г. Пущино*

² *Пуцинский государственный естественно-научный институт
yannaevstratova@gmail.com*

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПА МАКРОФАГОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Принято считать, что активно пролиферирующие незрелые клетки острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) чувствительны к апоптоз-индуцирующим воздействиям, в тоже время более зрелые клетки, для которых характерна сниженная пролиферативная активность, обладают повышенной устойчивостью к индукции апоптоза. Однако нами было обнаружено, что клетки ОМЛ могут трансформироваться в макрофагоподобные клетки, и при этом, сохраняя пролиферативную активность, становятся устойчивыми к индукторам клеточной гибели.

В данном исследовании были охарактеризованы фенотипы макрофагоподобных клеток острого миелоидного лейкоза. В качестве объекта исследования использовали клетки ОМЛ человека линии ТНР-1. Нами были получены два спонтанных клеточных варианта: клетки ТНР-1 способные к адгезии к внеклеточному матриксу (ТНР-1ad) и клетки способные к распластыванию на внеклеточном матриксе (ТНР-1sp). Для определения клеточного фенотипа и распределения клеток по фазам жизненного цикла использовали метод проточной цитометрии. Исследовали экспрессию моноцитарно-макрофагальных маркеров CD11b, CD14, CD45, CD68, СВ64, CD163 и проводили оценку относительного количества лизосом, митохондрий и продукции NO, с помощью окрашивания клеток LysoTracker Green DND-26, MitoTracker Green FM и DAF-FM DA, соответственно. Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили с помощью определения количества

ДНК, при окрашивании йодидом пропидия. Митотическую активность клеток оценивали прямым подсчетом митотических клеток, окрашенных Hoechst 33342. Фагоцитарное число определяли, как среднее значение частиц фагоцитированных одной клеткой с использованием карбоксилированных латексных микросфер, конъюгированных с родамином. Оценку секреции провоспалительных ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 проводили с помощью коммерческих наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации цитокинов.

Было показано, что пролиферативно активные клетки ОМЛ ТНР-1ad и ТНР-1sp, способные к адгезии и распластыванию на ВКМ, соответственно, имеют иммунофенотип свойственный для клеток, созревающих в моноцитарно-макрофагальном направлении. Также для клеток ТНР-1ad, способных к адгезии к ВКМ, характерна индуцибельная секреция ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α . Для клеток ТНР-1sp, способных к распластыванию на ВКМ, характерна индуцибельная секреция только ИЛ-6. В тоже время ни клетки ТНР-1ad, ни ТНР-1sp не обладают индуцибельным синтезом внутриклеточного NO и фагоцитарной активностью, однако относительное количество лизосом у клеток ТНР-1sp было достоверно выше (более чем в 3 раза) по сравнению с ТНР-1ad. Количество митохондрий достоверно не отличалось во всех клеточных вариантах.

Таким образом, клетки ОМЛ, способные к адгезии и распластыванию на ВКМ, могут приобретать некоторое характеристики зрелых клеток моноцитарно-макрофагального звена, на фоне сохранения пролиферативной активности и повышения лекарственной устойчивости.

Научный руководитель – Р.С. Фадеев, канд. биол. наук.

УДК 577.171.22:591.25:595.77

М.А. Еремина, Е.К. Карпова, Н.Е. Груntenко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,

г. Новосибирск

eremina@bionet.nsc.ru

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ИНСУЛИНОВОГО
СИГНАЛЬНОГО ПУТИ НА УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ
ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ У САМОК *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

В последние годы значительно вырос интерес к исследованиям механизмов сигнального пути инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР) у дрозофилы, что привело к использованию мух в качестве модельной системы изучения физиологии и развития метаболических заболеваний таких как ожирение и диабет.

И/ИФР участвует в регуляции различных функций, включающих рост, развитие, размножение, метаболический гомеостаз, продолжительность жизни и устойчивости к различным видам стресса. У *Drosophila melanogaster* И/ИФР хорошо изучен и включает 8 инсулиноподобных белков (DILP1-8). Эти DILPs связываются с единственным инсулиновым рецептором (InR), который активирует И/ИФР. Стимуляция рецептора приводит через ортолог субстрата инсулинового рецептора млекопитающих (SHCO) к активации протеинкиназы Akt, которая, в свою очередь, модулирует активность ряда белков и сигнальных путей, в частности, транскрипционного фактора семейства Forkhead boxclass O (dFOXO).

Нами впервые исследовано влияние гипоморфных мутаций гена инсулиноподобного белка DILP6 (*dilp6*), синтезируемого в жировом теле, и гена транскрипционного фактора dFOXO (*dfoxo*) на углеводный метаболизм у самок *D. melanogaster* при тепловом стрессе.

Установлено, что у самок *D. melanogaster*:

1) В нормальных условиях гипоморфные мутации генов *dilp6* и *dfoxo* приводят к повышению уровня основных циркулирующих сахаров гемолимфы – глюкозы и трегалозы.

2) При тепловом стрессе у мух с мутациями генов *dilp6* и *dfoxo* уровень обоих углеводов в гемолимфе возрастает.

Таким образом, двукратное снижение уровня экспрессии генов *dilp6* и *dfoxo* не препятствует развитию ответа системы углеводного метаболизма дрозофилы на тепловой стресс.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-02934 и бюджетного проекта № 0324-2016-0002.

Научный руководитель – Н.Е. Грунтенко, д-р биол. наук

УДК 616-01/09

К. В. Ермин^{1,2}, П. А. Логинов¹, М. М. Глявина^{1,2},
М. Жученко³, И. В. Мухина^{1,2}

¹*Нижегородская государственная медицинская академия
Минздрава России*

²*Национальный исследовательский нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского*

³*ООО «Фармапарк», г. Москва
ermin20@yandex.ru*

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ КРОВИ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ДЕЙСТВИИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ФОРМЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА

Модифицированные производные гормона эритропоэтина, обладающего плейотропным тканепротективным действием, рассматриваются как потенциальные агенты для цитопротекторной терапии при таких патологических состояниях, как инсульт и острая гипоксия. Негематопоэтические модификации эритропоэтина могут

оказывать действие через преференциальное связывания с β -рецепторной субъединицей (β cR), экспрессируемой на многих клетках организма, в том числе на иммунных клетках и в составе рецепторных комплексов, запускающих процесс сигнальной трансдукции ростовых факторов и цитокинов.

Оценивали различия в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови мышей C57BL/6 интактной группы ($n = 12$) и животных, получивших пятикратно в течении суток внутривенно субстанцию карбамилированного рекомбинантного дарбэпоэтина (CdEPO) (предоставлен ООО «Фармапарк», Россия) в дозе 50 мкг/кг на 4, 10 и 20 сутки после введения ($n \geq 7$). Анализ проводился методом проточной цитометрии (проточный цитометр BD FACS Canto II).

В ходе анализа в составе популяции В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD3^-$ клетки) во всех группах была определена неканоническая субпопуляция $NK1.1^+$ В-клеток. В литературе данных по данной субпопуляции не обнаружено. Средние значения доли этих клеток от общего числа В-лимфоцитов лежали в диапазоне 4,1—9,2%, статистически значимых различий между группами не отмечено.

Показано, что на 4 сутки после введения снижается доля НК клеток ($CD45^+NK1.1^+CD19^-CD3^-$) в общей лимфоцитарной фракции ($p = 0,027$; $M = 4 \pm 0,42$ % в интактной группе и $2 \pm 0,21$ % в опытной). Показатели для Т- ($CD45^+CD3^+$) и В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+$) после введения значимо не изменялись, среднее значение по группам находилось в диапазоне 27,5—41 % и 53—66 % соответственно.

Соотношение $CD8^+/CD4^+$ Т-лимфоцитов на 4 сутки было значимо выше, чем у интактной группы ($p = 0,0006$) и спустя 20 суток после введения ($p = 0,002$). Средние индексные значения $CD8^+/CD4^+$ составили, соответственно, $1,24 \pm 0,14$, $0,72 \pm 0,05$ и $0,8 \pm 0,045$.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что модифицированный эритропоэтин (карбамилированный дарбэпоэтин) обладает иммуномодулирующим действием, проявляющимся в регуляции вклада субпопуляций цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$ Т-клетки, НК клетки) в общую лимфоцитарную фракцию.

Научный руководитель — И. В. Мухина, д-р биол. наук, проф.

УДК 576.53, 576.364

М. И. Кобякова^{1,2}, Я. В. Евстратова^{1,2}, Р. С. Фадеев^{1,2}

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.
Пушино*

² *Пушинский государственный естественно-научный институт
ritaаааа49@gmail.com*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ

Ранее в наших работах было показано повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) в многоклеточных агрегатах к индукции клеточной гибели. В настоящее время, механизмы, опосредующие формирование агрегатов, и, соответственно, повышение лекарственной устойчивости остаются неизвестными. В тоже время, повышение лекарственной устойчивости опухолевых клеток в многоклеточных структурах (агрегатах, сфероидах) связывают с понижением пролиферативной активности клеток в составе таких структур. В данном исследовании была предпринята попытка оценки участия основных молекул межклеточной адгезии (МА), характерных для клеток ОМЛ, в формировании многоклеточных агрегатов, а также оценка пролиферативной активности клеток в этих агрегатах.

В качестве объекта исследования использовали клетки ОМЛ человека линий ТНР-1, формирующие многоклеточные агрегаты, и КG-1, не способные к клеточной агрегации. Для формирования многоклеточных агрегатов 96-луночные планшеты покрывали 1,5% раствором агарозы. Затем высевали по 5×10^3 клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды. В качестве контроля использовали клетки ТНР-1, посеянные в той же концентрации на поверхность культурального пластика, и не образующие крупных многоклеточных агрегатов. Идентификацию молекул межклеточной адгезии

проводили с помощью проточной цитометрии с использованием панели антител к ITGAL (CD11a), ITGAM (CD11b), ITGAX (CD11c), ITGB2 (CD18), ICAM-3 (CD50), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102). Пролиферативную активность оценивали по распределению клеток по фазам клеточного цикла и митотической активности. Распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли с помощью проточной цитометрии. Для определения митотической активности фиксированные клетки окрашивали флуоресцентным красителем bisBenzimide H33342.

При идентификации молекул МА было показано, что на поверхности клеток ТНР-1, способных формировать многоклеточные агрегаты, присутствуют CD11a, CD18, CD50, CD102. В свою очередь, на поверхности клеток КГ-1, не способных формировать многоклеточные структуры, присутствуют CD11a, CD18, CD50, CD54, CD102. Так как экспрессия исследуемых молекул МА была показана на поверхности клеток как способных, так и не способных к клеточной агрегации, мы предполагаем, что данные молекулы МА, вероятно, не участвуют в формировании многоклеточных структур.

Далее было показано, что в многоклеточных агрегатах распределение клеток по фазам клеточного цикла составляло $53 \pm 3\%$ для G1-фазы, $40 \pm 3\%$ для S-фазы и $8 \pm 1\%$ для G2/M-фаз, что достоверно не отличалось от контрольных условий. В свою очередь, анализ митотической активности показал, что количество митотических клеток в многоклеточных агрегатах составляло $2,6 \pm 0,4\%$, что также достоверно не отличалось от контроля ($2,1 \pm 1,2\%$).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что идентифицированные молекулы МА, вероятно, не принимают участия в формировании многоклеточных структур клетками ОМЛ, а также, что в многоклеточных агрегатах фенотипом лекарственной устойчивости могут обладать активно пролиферирующие клетки.

Научный руководитель – Р.С. Фадеев, канд. биол. наук.

ВНЕСЕНИЕ МУТАЦИЙ В ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ САЙТЫ ДИМЕРИЗАЦИИ БИНАЗЫ

Димеризация играет важную роль в функционировании многих белков. К примеру, биологические эффекты некоторых эукариотических рибонуклеаз (РНказы BS, РНказы L), такие как повышенная цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, обусловлены образованием димеров. В частности, димерные формы РНказы BS устойчивы к действию ингибитора РНказ (ИР), к которому прокариотические РНказы, например, биназа *Bacillus pumilus*, не чувствительны. Эта особенность делает их более перспективными противоопухолевыми агентами. Что касается димеризации биназы, её значение как для бактериальной популяции, так и для проявления цитотоксичности к опухолевым клеткам, до конца не ясно. Она может влиять на эффективность связывания фермента с поверхностными структурами клеток, а также приводить к усилению цитотоксичности из-за повышения РНказной активности. Предполагается, что в естественных условиях, в отличие от кристаллов, не один, а оба активных центра фермента могут быть открыты. Об этом говорит большая РНказная активность димера по сравнению с мономером, зарегистрированная методом зимографии, а также результаты теоретических расчетов способов ассоциации мономеров биназы в растворе, согласно которым наиболее высокая константа скорости ассоциации димеров характерна для модели именно с двумя открытыми активными центрами. Таким образом, целью настоящей работы стала экспериментальная проверка данной теоретической модели димеризации биназы для прояснения её механизма и устранения накопившихся противоречий по этому вопросу.

Проанализировав имеющиеся данные, было принято решение методом сайт-направленного мутагенеза внести нейтральную замену в потенциальный сайт димеризации биназы Arg15, выявленный в этой модели, для установления важности и механизма образования димеров биназой. Выбор этой аминокислоты в качестве мишени обусловлен тем, что она образует немалое число контактов, обеспечивающих наибольшую энергетическую стабильность димеров. Чтобы выяснить, является ли ключевой роль Arg15 в димеризации биназы в естественных условиях, было принято решение заменить его на нейтральный аланин, не нарушающий конформацию основной цепи, не вносящий электростатических или стерических эффектов. С использованием сконструированных праймеров (прямого с соответствующей заменой и обратного без замены) и плазмиды pML5 в качестве ДНК матрицы была проведена ПЦР-амплификация. Для подтверждения наличия замены Arg15Ala в гене биназы фрагмент был секвенирован по Сэнгеру в обоих направлениях. Контиги выравнивали и сравнивали с нативным геном биназы. В результате было установлено, что плазмиды содержали искомую замену.

Таким образом, была получена генетическая конструкция, несущая ген биназы с мутацией по сайту димеризации Arg15Ala. В дальнейшем для наработки мутантного белка ген биназы будет клонирован в вектор экспрессии с целью изучения физических и структурных особенностей белка и экспериментального обоснования теоретически построенной модели.

Научный руководитель – В.В. Ульянова, канд. биол. наук

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МИКРОРНК В РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Каждый год онкологические заболевания обнаруживаются у 10 миллионов человек в мире. Рак занимает второе место среди причин смертности, в связи с чем лучевая терапия является одним из наиболее важных и распространенных методов терапии рака. Радиорезистентность раковых опухолей приводит к рецидивам и метастазированию, поэтому исследование ее механизмов является критически важным. В настоящее время накопленные доказательства исследований подтверждают, что микроРНК и различные внутриклеточные сигнальные пути играют большую роль в приобретении радиорезистентности раковыми клетками. Таким образом, изучение роли микроРНК может быть полезно в преодолении радиорезистентности.

Исследование проводилось на двух раковых клеточных линиях - радиорезистентной K562 и радиочувствительной HL-60. Клетки инкубировали в стандартных условиях, в соответствии с рекомендациями ATCC (American Type Culture Collection). Облучение осуществляли на линейном ускорителе Elekta Synergy (Швеция), затем проводили секвенирование микроРНК на Illumina MiSeq через 1, 4 и 24 часа после облучения. Все эксперименты выполнялись в трех повторах.

В результате секвенирования была определена экспрессия микроРНК в каждой клеточной линии. Для более углубленного изучения причин радиорезистентности раковых клеток нами был выполнен биоинформационный анализ взаимодействия микроРНК и внутриклеточных сигнальных путей. После облучения были выявлены сигнальные пути, в которых функционирование значительно отличалось

от контроля. В радиорезистентной клеточной линии K562 наибольшие изменения давления микроРНК по сравнению с контролем наблюдаются в сигнальных путях Amoebiasis и Type II diabetes mellitus через 4 часа после облучения. В радиочувствительной клеточной линии HL-60 изменения выявлены в сигнальных путях Calcium signaling pathway, Long-term depression и VEGF signaling pathway через 24 часа после облучения.

Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что радиочувствительные и радиорезистентные клеточные линии отвечают по-разному на радиационное воздействие и имеют значительные отличия в регуляции работы сигнальных путей посредством микроРНК. Анализ влияния микроРНК на сигнальные пути показал, что в радиорезистентной клеточной линии K562 усилено действие микроРНК на Amoebiasis и Type II diabetes mellitus, а в радиочувствительной клеточной линии HL-60 на сигнальные пути Calcium signaling pathway, Long-term depression и VEGF signaling pathway.

Научный руководитель – Ю. В. Саенко, д-р биол. наук.

УДК 574.32

Е.С. Нассонова

*Пермский государственный национальный исследовательский
университет*

[lena.nassonova@mail.ru](mailto:lana.nassonova@mail.ru)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЯТИ ПОПУЛЯЦИЙ *P. SYLVESTRIS L.* КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ И ПЕРМСКОГО КРАЯ

Древесина – один из наиболее востребованных ресурсов. В современный период широкое распространение получило такое преступление, как незаконная рубка лесных насаждений. Ущерб, причиненный незаконной вырубкой, порой может достигать нескольких миллионов рублей. Следовательно, необходима

идентификации древесных видов растений на популяционном уровне для выявления и контроля незаконных рубок,. Целью данной работы является молекулярно-генетический анализ пяти популяций *Pinus sylvestris* L. в Кировской области и Пермском крае.

При молекулярно-генетическом анализе *P. sylvestris* выявлено 126 ISSR-маркеров, из которых 122 были полиморфными ($P_{95}=0,968$). Доля полиморфных локусов в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,916 до 1,000. В изученных выборках сосны обыкновенной выявлено 5 уникальных ISSR-маркеров, из которых в выборке **PsI** выявлен 1, в выборках **PsII** и **PsV** по 2 уникальных ISSR-маркеров, а в выборках **PsIII** и **PsIV** таких ISSR-маркеров выявлено не было. Доля полиморфных локусов (P_{95}) локусов выше в популяции **PsII** ($P_{95}=0,951$), ниже в **PsV** ($P_{95}=0,782$), а на общую выборку составила 0,968. Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_E) на общую выборку *P. sylvestris* составила 0,219. Этот показатель наибольший в выборке **PsIV** ($H_E = 0,239$), а наименьший ($H_E = 0,203$) – в выборке **PsII**. Оценка достоверности при сравнении долей полиморфных локусов и ожидаемой гетерозиготности между выборками по критерию Фишера показала, что значимых отличий между выборками нет.

На основании полученных ISSR-спектров, удалось обнаружить идентификационные фрагменты или их сочетания для всех изученных выборок. Установлены три видовых ISSR-маркера, выявленные у всех изученных выборок: $PS_{\nu}540_{M27}$ $PS_{\nu}460_{M27}$. Установлен родовой маркер на основе сравнения ISSR-спектров двух видов *P. sylvestris* и *Pinus sibirica* Du Tour с праймером CR-215: $PIN_{\tau}250_{CR215}$. Так же удалось выявить полиморфные идентификационные ISSR-маркеры или их сочетания для выборок, с достаточно высокой частотой встречаемости.

Для описания генетической структуры популяции были рассчитаны следующие параметры: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей популяции равна 0,318; ожидаемая доля

гетерозиготных генотипов (H_S) в субпопуляции равна 0,218; доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии (G_{ST}) равна 0,312.

На основании полученной матрицы был проведен кластерный анализ невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) и построена дендрограмма. На дендрограмме выборки образовали три кластера, с высокой поддержкой бутстрепа – в первый входят выборки **PsI** и **PsII**; во второй – **PsIII** и **PsIV**; в третий – **PsV**. Что согласуется с географическими расстояниями. Анализ популяционной структуры в программе STRUCTURE 2.3.4 показал, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой выборки на три кластера, соответствующим трем генетическим популяциям.

Научный руководитель – Ю.С. Нечаева, канд. биол. наук

УДК 571.56

О.А. Неустроева, А.Р. Каюмов

Казанский федеральный университет

neustroeva.olga@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА GLNR ИЗ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 8 PA-3

Для усвоения азота, который является одним из необходимых макроэлементов для микроорганизмов, у бактерий существует несколько различных путей, в зависимости от того, в состав каких соединений он включен. Наиболее предпочтительные источники - те, которые требуют минимальных энергетических затрат на их ассимиляцию клеткой бактерии. Такими соединениями являются глутамин и ионы аммония, которые вовлекаются в азотный метаболизм напрямую. Поэтому, в целях рационального использования энергии экспрессия генов азотного обмена

подвержена строгому контролю. Одним из основных регуляторов азотного метаболизма в грамположительных бактериях является фактор транскрипции GlnR. В некоторых организмах он выступает, как репрессор, в некоторых как активатор. Причем данный фактор транскрипции способен регулировать не только отдельные гены, но и целые регулоны, имея несколько сайтов связывания на геномной ДНК. В геноме лактобацилл нами идентифицирован ген *glnR*, кодирующий данный фактор транскрипции. Но остается неизвестным, при каких условиях белок GlnR взаимодействует с ДНК. Целью данной работы было охарактеризовать ДНК-связывающую активность белка GlnR из *Lactobacillus plantarum* 8 PA-3. Для этого экспрессионной плазмидой, несущей ген *glnR* из *L. plantarum* трансформировали штамм *E. coli* BL-21. Далее отбирали клон с максимальным уровнем гиперпродукции белка. Проводили очистку рекомбинантного белка GlnR методом афинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе, в результате чего нами было получено 10 мг белка. Далее провели выравнивание последовательностей GlnR из *L. plantarum* и *Bacillus subtilis*, которое показало, что ДНК-связывающий домен белка GlnR у двух близкородственных микроорганизмов имеет высокую степень гомологии и это позволяет ожидать сходство сайтов распознавания. Затем при помощи метода задержки ДНК в геле определяли ДНК-связывающую способность очищенного рекомбинантного белка. Для этого путем гибридизации двух взаимодополнительных праймеров получали двуцепочечную ДНК размером 30 п.н., которая соответствовала фрагменту промотора гена *glnR* из *L. plantarum* и несла сайт связывания гомологичный сайту связывания для белка бацилл. Так как для белка из бацилл показана необходимость глутамина и глутаминсинтетазы для проявления ДНК-связывающей активности, эксперименты были также проведены в присутствии бациллярной глутаминсинтетазы, которая имеет 81% гомологии с ферментом *L. plantarum* (из данного микроорганизма

глутаминсинтетазу очистить не удалось). Так как результаты показали, что GlnR из *L.plantarum* образует слабо стабильный комплекс с ДНК-последовательностью, вне зависимости от присутствия глутаминина и глутаминсинтетазы в растворе, следующей задачей будет идентифицировать гены-мишени данного фактора транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-02583а.

Научный руководитель – А.Р. Каюмов, доцент кафедры генетики, канд. биол. наук.

УДК 577.218

В.И. Першин¹, Е.Л. Гурьев², Л.К. Курбатов³, М.Р. Гайнуллин²

¹ *Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского*

² *Нижегородская государственная медицинская академия*

³ *Научно-исследовательский институт биоорганической химии им. В.Н. Ореховича*
bp1995@yandex.ru

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПА ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ В ГИАЛУРОНИДАЗА-ЗАВИСИМОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ *IN VITRO*

Судорожная активность при эпилепсии, как правило, характеризуется изменениями в составе внеклеточного матрикса мозга (ВКМ), что доказывает существенную роль молекул ВКМ в эпилептогенезе. Транскриптомный анализ позволяет проводить скрининг изменения экспрессии всех генов одновременно и выявлять возможные сигнальные пути, обуславливающие изменение метаболизма клеток в ответ на разрушение внеклеточного матрикса мозга.

Целью работы являлось исследование изменения уровня экспрессии генов в гиалуронидаза-зависимой модели эпилепсии *in vitro* биоинформационными методами.

На модели культивирования диссоциированных клеток гиппокампа эмбрионов мышей (E18) в течение 17 дней *in vitro* было исследовано изменение экспрессии генов после аппликации гиалуронидазы (75U/мл) в культуральную среду в течение суток. В ходе транскриптомного анализа на микрочипах платформы Agilent (США) было детектировано 1520 дифференциально-экспрессирующихся генов.

Выявлено, что через 2 часа после обработки гиалуронидазой внеклеточного матрикса, синтезируемого при культивировании диссоциированными клетками гиппокампа с 9-го по 19-й день развития культуры *in vitro*, происходит достоверное снижение экспрессии генов комплекса сигнального белка кальцийнейрина.

По данным проведенного биоинформационного анализа транскриптома первичной культуры клеток гиппокампа ключевой группой генов, участвующих в сигнальных механизмах возникновения гиалуронидаз-зависимых изменений активности нейронных сетей первичной культуры гиппокампа эмбрионов мышей (E18) на 17-й день развития, является группа генов, кодирующих кальмодулин-зависимую фосфатазу. Поскольку кальмодулин-зависимая фосфатаза входит в комплекс белка кальцийнейрина, можно предположить, что разрушение гиалуроновой кислоты, как основного структурного элемента внеклеточного матрикса мозга, запускаются процессы кластеризации и диффузии мембранных рецепторов, изменяются процессы синаптической передачи и стимулируются процессы клеточной смерти.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01763.

Научный руководитель – д-р биол. наук, проф., И.В. Мухина.

УДК 575.825.5

Ж. В. Петунина^{1,*}, Ю. С. Букин^{1,2}

¹Лимнологический институт, Иркутск

²Иркутский государственный технический университет
petuninajmk@mail.ru

БАЙКАЛЬСКАЯ АМФИПОДА *GMELINOIDES FASCIATUS*: СВЯЗЬ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ С ПАЛЕОКЛИМАТИЧЕСКОЙ ИСТОРИЕЙ ОЗЕРА

Древние озера, в число которых входит озеро Байкал, известны чрезвычайно большим уровнем биоразнообразия. Большая доля видов, населяющих эти водоемы, является эндемиками, сформировавшимися в течение продолжительного времени в условиях достаточной изоляции экосистем от притока новых видов извне.

Все процессы видовой дивергенции, процессы микроэволюции, протекают на уровне отдельных популяций. В условиях изолированных популяций происходит адаптация к существующим локальным условиям среды с изменением морфологических, биохимических и других характеристик особей. Изучая популяционную структуру видов и способы формирования внутривидового и внутривидового разнообразия можно понять, каким образом формируются богатые эндемиками экосистемы древних озер.

Амфиподы вида *Gmelinoides fasciatus* являются одним из доминирующих видов в сообществе литоральной зоны озера Байкал. В пределах ареала вида на основе анализа митохондриального маркера COX1 было выделено четыре изолированных популяции, между которыми не существует выраженных географических барьеров.

Возможно, в прошлом такие географические барьеры появлялись в результате климатических изменений, связанных с периодами глобальных похолоданий, формируя наблюдаемую популяционную структуру вида. Высказанное предположение проверяется путем филогенетической реконструкции эволюционной истории популяций *Gmelinoides fasciatus* с учетом гипотезы молекулярных часов. Время расхождения популяций датируется начальным моментом

климатических колебаний на границе Плейстоцена и Плиоцена (1.8 - 2.3 миллиона лет назад). В результате оцененная скорость накопления замен в маркере COX1 для *Gmelinoides fasciatus* составила 0.012-0.024 долей замен на миллион лет, что соответствует значениям, определенным для других групп беспозвоночных.

Результаты проведенного анализа подтверждают наше предположение о механизмах формирования современной популяционно-генетической структуры байкальского эндемика *Gmelinoides fasciatus* – воздействие глобальных климатических изменений в период конца Плиоцена - Плейстоцена. Периодические чередования периодов похолодания и потепления приводили к колебаниям продуктивности экосистемы озера Байкал. В холодные периоды с низкой продуктивностью озера между существующими популяциями *Gmelinoides fasciatus* формировались географические барьеры – участки литорали с низкой продуктивностью непригодные для жизни исследуемого вида. Периодически, то появляясь, то исчезая, такие барьеры как отпечаток зафиксировались в современном генетическом портрете вида.

УДК 575.8

М. А. Побединцева^{1,2}, А. И. Макунин², Н. А. Сердюкова²,
А. С. Дружкова², А. С. Графодатский^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г.

Новосибирск

mapob@mcb.nsc.ru

ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ О ПОЛНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГАПЛОГРУПП СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS* И СИБИРСКОГО ОСЕТРА *A. BAERII*

Осетрообразные (*Acipenseriformes*) - древнейший отряд класса Лучеперых рыб, в реках Сибири представлен стерлядью (*Acipenser ruthenus*) и сибирским осетром (*A. baerii*). В литературе данный отряд часто называют «живыми ископаемыми», поскольку близкие к

современным видам ископаемые формы осетрообразных были обнаружены уже в позднем меловом периоде (100 млн лет назад).

В настоящее время филогения осетровых остается противоречивой, сохраняются проблемы с идентификацией отдельных видов, а также поднимаются вопросы о выделении подвидов внутри вида.

Ранее нами была собрана большая коллекция образцов ткани стерляди и сибирского осетра из некоторых европейских рек и рек Сибири, и на основании секвенирования по Сэнгеру контрольного района митохондриальной ДНК были выявлены основные гаплотипы и гаплогруппы а также показана изоляция между популяциями бассейнов разных рек. Однако анализ короткого участка мтДНК не может дать точных данных о молекулярной датировке расхождения основных гаплогрупп.

Поэтому для уточнения оценки времени базальной дивергенции внутри обоих видов, мы перешли к рассмотрению полных митохондриальных геномов основных гаплогрупп обоих видов.

Для представителей основных гаплогрупп стерляди и сибирского осетра, а также шипа (*A. nudiventris*) (родственного стерляди вида) было проведено обогащение митохондриальной ДНК, секвенирование на платформе Illumina MiSeq и сборка полных митохондриальных геномов. На основании полученных нами данных с привлечением ранее опубликованных митохондриальных геномов мы построили филогенетическое древо и рассчитали времена дивергенции основных гаплогрупп. Общая топология древа не противоречит ранее опубликованным данным, а так же уточняет положение шипа как ближайшего к стерляди вида. По впервые полученным для полных митохондриальных геномов популяционным данным, гаплогруппы стерляди сформировались гораздо раньше, чем произошла дивергенция некоторых других видов осетровых, что диктует необходимость пересмотра видовых статусов некоторых представителей семейства осетровых.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-14-0027500275 и программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2016-0010.

Научный руководитель – канд. биол. наук Трифионов В. А.

УДК 575.2:575.22:574.3

Я.В. Пришнивская

*Пермский государственный национальный исследовательский
университет*

yana_prishnivskaya@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЧЕТЫРЕХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Для решения современных проблем сохранения и возобновления лесов необходима оценка биоразнообразия лесных экосистем, важным элементом которой является генетическое разнообразие популяций основных лесобразующих видов растений, одним из которых является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.).

Объектами исследований являлись четыре популяции *P. sylvestris*, произрастающие в Кировской области: *Ps13* – в Даровском лес-ве, *Ps14* – в Юрьянском лес-ве, *Ps15* – в Слободском лес-ве, *Ps16* – в Белохолиницком лес-ве.

При анализе фрагментов ДНК, амплифицированных в результате ПЦР с использованием ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) -метода анализа полиморфизма ДНК, в изученных популяциях выявлено 96 ISSR-маркеров, из которых 80 были полиморфными ($P_{95}=0,833$). Число амплифицированных ISSR-фрагментов варьировало в зависимости от праймера от 12 (праймер (CT)₈TG) до 18 (праймер (AGC)₆C). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 15,5 фрагментов ДНК. Доля полиморфных локусов в выборке в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,385 до 0,824. Доля полиморфных локусов выше в популяции *Ps16* ($P_{95}=0,705$), а ниже в *Ps13* ($P_{95}=0,486$). Отличия максимального и минимального значения этого показателя между двумя указанными популяциями по критерию Фишера значимы ($F=2,16$, что выше, чем $F_{ST}=1,96$).

Ожидаемая гетерозиготность по локусам в общей выборке составила 0,173; в популяции *Ps15* этот показатель максимальный ($H_E=0,237$), а в популяции *Ps13* этот – минимальный ($H_E =0,110$). Отличия незначимы ($F=1,64$, что ниже, чем $F_{ST}=1,96$.)

Абсолютное число аллелей на локус (n_a) на общую выборку составило 1,885. Этот показатель наивысший в популяции *Ps15* ($n_a=1,646$), в популяции *Ps13* он наименьший ($n_a=1,365$). Эффективное число аллелей на локус (n_e) на общую выборку равно 1,559. Эффективное число аллелей выше в популяции *Ps16* ($n_e=1,410$), а ниже – в популяции *Ps14* ($n_e=1,173$). Для характеристики генетической структуры популяций полезны редкие, то есть встречающиеся с частотой менее 5%, ISSR-маркеры. В популяции *Ps16* выявлено наибольшее число уникальных ISSR-маркеров – 2, характерных лишь для этой популяции; а в *Ps13*, *Ps14* и *Ps15* выявлено по 1 уникальному ISSR-маркеру соответственно.

Анализ генетической структуры изученных популяций *P. sylvestris* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) на общую выборку составила 0,321, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) равна 0,173; поэтому коэффициент подразделенности популяций (G_{ST}) составил 0,461. Таким образом, на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия приходится 46,1%, то есть изученные популяции *P. sylvestris* сильно дифференцированы. На наибольшем генетическом расстоянии (D) находятся популяции *Ps13* и *Ps16* ($D=0,467$), а наименьшее генетическое расстояние между *Ps13* и *Ps14* ($D=0,071$).

Научный руководитель – д-р биол. наук, проф., С.В. Боронникова.

УДК 579.253.4

Р. А. Проттой¹, А. А. Музыкантов^{1,2}, М. Н. Синягина¹,
Т. Ю. Малыгина², Е. С. Медведева^{1,2}

¹**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

²**КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ
КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН**

reshadru@gmail.com

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ АДАПТАЦИИ МИКОПЛАЗМ К
АНТИБИОТИКАМ: ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМНОГО
И ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЕЙ У ШТАММОВ *A. LAIDLAWII*,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К ТЕТРАЦИКЛИНУ**

Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему. Микоплазмы (класс Mollicutes) быстро развивают устойчивость к антимикробным препаратам. Предполагается, что наряду с известными механизмами, существенную роль в формировании устойчивости бактерий к антибиотикам играют везикулярный трафик, эпигенетические изменения и множественные мутации, определяющие повышение стресс-реактивности. Сравнительный анализ профилей геномов, а также везикулярных протеомов различающихся по чувствительности к тетрациклину штаммов *Acholeplasma laidlawii* - «вездесущей микоплазмы», основного контаминанта клеточных культур и возбудителя фитомикоплазмозов, явился задачей наших исследований. Для проведения анализа применялись методы секвенирования геномов (Illumina), электрофореза и масс-спектрометрии белков (1D-LC-ESI-MS/MS).

В результате анализа геномов штаммов *A. laidlawii* обнаружено, что формирование устойчивости микоплазмы к тетрациклину связано с существенными изменениями в геномном профиле бактерии. В геноме *A. laidlawii* PG8RTet - микоплазмы с повышенной устойчивостью к

тетрациклину, было выявлено 203 мутации (SNP), в том числе 184 в кодирующей части генома, из которых 160 значимые. Мутации были обнаружены в генах, продукты которых ассоциированы с фундаментальными клеточными процессами, вирулентностью и адаптацией бактерий к другим стрессорам, в том числе антимикробным препаратам, в отношении которых микоплазмы индифферентны (пенициллин, рифампицин, даптомицин).

В результате анализа везикулярных протеомов штаммов *A. laidlawii* было обнаружено, что формирование устойчивости микоплазмы к тетрациклину связано с модуляцией секретома, ассоциированного с внеклеточными везикулами бактерии. В составе везикул, продуцируемых клетками *A. laidlawii*, обнаружены белки, участвующие в эпигенетической регуляции, адаптации бактерий к антимикробным препаратам и реализации вирулентности, спектр которых у штаммов существенно различается. Часть везикулярных белков *A. laidlawii* PG8RTet является продуктами генов, в которых регистрируются значимые мутации. Модуляция везикулярного трафика и опосредованный везикулами перенос мутантных белков в популяции микроорганизмов могут определять оперативные изменения метаболизма, существенные для выживания бактерий в неблагоприятных условиях среды.

Полученные нами данные указывают на то, что формирование устойчивости к антимикробным препаратам у микоплазм к антибиотикам может быть связано с глобальным репрограммированием биохимических процессов и изменением вирулентности.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ № 15-44-02594; 16-34-00660.

Научный руководитель – О.А. Чернова, д-р биол. наук, проф.

УДК 577.218

М.С. Саби́ров, А.Н Бончук, О.Г. Максименко, П.Г. Георгиев

Институт биологии гена РАН, Москва

mariosabirov@gmail.com

ОСОБЕННОСТИ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ВНУТРИ ИНСУЛЯТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER*

Организация хроматина ядер различных клеток многоклеточного организма уникальна и отражает специфичную программу реализации наследственного аппарата. Архитектура хроматина устанавливается и поддерживается за счет белок-белковых взаимодействий между определенными наборами белков хроматина.

Одним из основных «организаторов» хроматина являются инсулятор-связывающие белки, способные рекрутировать на хроматин ремоделирующие комплексы, когезин и различные транскрипционные факторы. Универсальным компонентом инсуляторных комплексов *Drosophila* является белок CP190 (Centrosomal Protein 190), который взаимодействует со всеми известными инсулятор-связывающими белками.

В данной работе изучаются элементы, определяющие специфичность белок-белковых взаимодействий белка CP190 с некоторыми ДНК-связывающими инсуляторными белками. Ранее нами было показано, что CP190 способен напрямую взаимодействовать с белками dCTCF и Pita. Оба белка обладают специфичной ДНК-связывающей активностью благодаря расположенным на С-конце кластерам цинковых пальцев C2H2-типа, при этом на N-конце этих белков находятся гомодимеризующиеся домены. Белок CP190 имеет на своём N-конце ВТВ-домен (brick to brack), способный к мультимеризации. Именно при помощи этого домена белок CP190 взаимодействует с белками dCTCF и Pita. При

помощи дрожжевой двугибридной системы и экспериментов *in vitro* в составе белков dCTCF и Pita удалось локализовать пептиды, необходимые для связывания с CP190. Нами была получена кристаллическая структура ВТВ-домена CP190 в высоком разрешении (порядка 1.3 ангстрем), что позволило детально охарактеризовать потенциальный пептид-связывающий желобок и предположить аминокислоты, наиболее значимые для взаимодействия с участками dCTCF и Pita. Проведя аланиновый скрининг в дрожжевой двугибридной системе мы обнаружили, что наиболее критичными для взаимодействия с dCTCF и Pita являются замены гидрофобных аминокислот. Стоит отметить, что пептиды dCTCF и Pita продемонстрировали разную чувствительность к аминокислотным заменам в составе ВТВ-домена, что потенциально позволяет избирательно нарушать связывание CP190 с изучаемыми белками.

На модели *in vivo* в дрозофиле были экспрессированы мутантные формы белков на фоне инактивированных эндогенных. В результате оказалось, что аминокислотные замены и делеции, нарушающие связывание ВТВ-домена CP190 с dCTCF и Pita, в составе изучаемых белков вызывают снижение жизнеспособности, стерильность, доминантно-негативные эффекты, различные деформации крыльев и другие нарушения. Дальнейший анализ позволит выявить изменения, происходящие на уровне хроматина при нарушении связывания CP190 с белками dCTCF и Pita.

Работа выполняется при поддержке грантом РФФИ-14-24-00166.

Научный руководитель – П.Г. Георгиев, д-р биол. наук, акад. РАН.

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСПОРТНОЙ СПОСОБНОСТИ ОРГАНИЧЕСКИХ МИКРОКАПСУЛ ДЛЯ ДОСТАВКИ КОРОТКИХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

РНК-интерференция в настоящее время считается одним из перспективных направлений лечения острых бактериальных и вирусных инфекций. В литературе показаны успешные попытки ингибирования репликации вируса гриппа короткими интерферирующими РНК (siРНК) *in vitro* и даже *in vivo*. Однако физико-химические свойства молекулы siРНК делают невозможным ее направленную доставку. Поэтому интересным объектом исследования представляется разработка системы высокоспецифичной и эффективной доставки siРНК в клетки. Большое внимание различных научных коллективов в этой области было уделено поликатионным носителям, которые обладают низкой иммуногенностью и способны связывать большое количество молекул siРНК, благодаря электростатическим взаимодействиям. Тем не менее, поликатионная доставка считается неэффективной из-за высоких концентраций полимера, необходимых для качественного и значимого эффекта осуществляемой в клетке РНК–интерференции.

В данной работе изучалась проникающая способность альтернативного средства доставки – гибридных органических – SiO₂ микрокапсул. И в результате было проведено сравнение с уже существующими коммерческими средствами. Для этих целей были выбраны и изучены хитозаны MGly (Sigma) и Q-348, полиэтиленимин – PEI (Sigma) и реагент Lipofectamine 2000.

Комплексы siРНК, содержащей флуоресцентную метку FAM на 3'-конце, с поликатионами были созданы путем смешивания

эквивалентных объемов водных растворов нуклеиновых кислот и растворов поликатионов с различной концентрацией. При этом достигались следующие соотношения азотных групп поликатиона к фосфатным группам РНК (в расчёте на один нуклеотид и одно мономерное звено): 1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1/1.

Проникновение комплексов siРНК в клетки карциномы легких А549 оценивалось по данным флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток с метками FAM, DAPI в интервале от 20 минут до 24 часов. Флуоресценция детектировалась на мультифункциональном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH, Germany) при длинах волн 470 и 360 нм. Все значения были нормализованы с учетом фонового контроля. Итоговые данные принимались как отношение количества флуоресценции при 470 нм к 360 нм, при этом опыт с капсулами был принят за 100%.

В результате по визуальной оценке интенсивности флуоресценции метки FAM в живых клетках в опыте с микрокапсулами наблюдалась наибольшая эффективность доставки siРНК, принятая за 100%. Максимально проникающая способность поликатионов составила соответственно: хитозан MGly – 20% (N/P-4/1), PEI – 41% (16/1), хитозан Q348 – 48% (2/1), Lipofectamine 2000–80%.

Таким образом, сравнительный анализ изученных средств доставки siРНК в клетки показал наилучшую кинетику у гибридных органических кремниевых микрокапсул. Полученные результаты позволяют продолжить исследование капсул на цитотоксичность и противовирусную активность в отношении вируса гриппа А.

Научный руководитель – А.Н. Горшков, канд. биол. Наук, НИИ Гриппа МЗ РФ, г. Санкт-Петербург.

УДК 575.1, 612.76, 612.22

Е.А. Семенова¹, Н.В. Морозов¹, Н.А. Кулемин², Е.С.

Кострюкова², А.К. Ларин²

¹ *Казанский федеральный университет*

² *Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины ФМБА России, г. Москва*

alecsekaterina@gmail.com

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВЫНОСЛИВОСТИ

Разнообразные способности к двигательной деятельности могут быть охарактеризованы с точки зрения пяти основных физических качеств: быстроты, силы, выносливости, гибкости и ловкости. Данные качества человека в разной степени генетически детерминированы и передаются по наследству. С помощью современных методов изучения генома человека появилась возможность определения генетических маркеров, связанных с развитием и проявлением физических качеств, а также со склонностью к определенной спортивной деятельности. Полученные результаты можно использовать на ранних этапах спортивного отбора и ориентации. Цель работы заключалась в проведении полногеномного анализа для определения генетических маркеров выносливости. Опытная группа состояла из российских спортсменов (стайеров и средневики; n=211). Данные генотипирования спортсменов сравнивали с данными контрольной группы (жители РФ, n=252). Генотипирование проб на 1140419 ДНК-полиморфизмов (снипов) осуществляли с помощью микрочипов HumanOmni1-Quad BeadChips (Illumina Inc, USA). Значимость полученных результатов проверяли на японской популяции (60 стайеров и 406 лиц контрольной группы), а также с использованием функционального исследования (анализ аэробных возможностей методом оценки максимального потребления кислорода). На первом этапе 30628 снипов показали значимость ($P < 0.05$) при сравнении группы российских стайеров с контрольной группой, из которых ассоциация

воспроизвелась по 93 снипам при сравнении группы российских средневикунов с контрольной группой. В дальнейшем эти данные воспроизвелись по 15 снипам при сравнении группы японских стайеров с контрольной группой. Функциональный анализ показал, что из 15 маркеров выносливости 6 маркеров также положительно ассоциируются с высокими аэробными возможностями в одной из выборок (российские спортсмены либо японцы, не занимающиеся спортом): rs4409473 гена NACC2, rs17685537 гена LOC105374539, rs938817 гена ARHGAP15, rs12199205 гена RPL15P3, rs3857490 межгенного участка, rs1799945 гена HFE. Таким образом, многоэтапное исследование выявило 6 маркеров выносливости, которые можно использовать в спортивном отборе.

Научный руководитель – Н.В. Морозов, д-р биол. наук., проф.

УДК 577.29

О. С. Троицкая^{1,2}, А. В. Ткаченко², Г. В. Кочнева³,
В. А. Рихтер², О. А. Коваль^{1,2}

¹ *Новосибирский государственный университет*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, г. Новосибирск*

³ *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, наукоград Кольцово
troitskaya_olga@bk.ru*

ИНДУКЦИЯ ИММУНОГЕННОГО АПОПТОЗА РЕКОМБИНАНТНЫМИ ВИРУСАМИ ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИМИ АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

Несмотря на то, что клиническая эффективность онколитических вирусов была показана для внутриопухолевого введения, способность вызывать иммунозависимую регрессию отдаленных метастазов до сих пор слабо изучена. Для усиления противоопухолевых свойств вируса осповакцины генно-инженерным путем были сконструированы рекомбинантные вирусы VV-GMCSF-

Lact и VV-GMCSF-Apo, кодирующие ГМ-КСФ человека и проапоптотические белки лактаптин и апоптин, соответственно.

Целью работы являлось исследование индукции иммуногенного типа гибели опухолевых клеток, инфицированных двойными рекомбинантными вирусами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo *in vitro* и *in vivo*. Для ряда противоопухолевых агентов, таких как доксорубин, оксалиплатин, онколитические вирусы, показано, что апоптоз раковых клеток сопровождается определенной комбинацией сигналов, узнаваемой дендритными клетками, которые запускают активацию антиген-специфических Т-лимфоцитов, что приводит к формированию долгосрочной защитной противоопухолевой иммунной реакции. Такой тип клеточной гибели был назван иммуногенным апоптозом, и показано, что его основными признаками являются: экспозиция калретикулина и HSP70 на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны клетки, выход АТФ и ядерного белка HMGB1 во внеклеточное пространство.

Мы показали, что рекомбинантные вирусы осповакцины VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo могут вызывать иммуногенный апоптоз *in vitro*. Показано, что внутриопухолевые инъекции вирусов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo эффективно подавляют рост солидных опухолей в экспериментах *in vivo*. При исследовании эффекта вакцинации, обусловленного иммуногенным апоптозом, в экспериментах *in vivo* показано, что трансплантация опухолевых клеток с индуцированным в них апоптозом под действием препарата сравнения – рекомбинантного аналога лактаптина RL2, оказывает вакцинирующее действие в 37,5% случаев в отношении трансплантированных живых опухолевых клеток. Клетки, зараженные рекомбинантными вирусами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF, не оказывают вакцинирующего эффекта.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01232.

Научный руководитель – канд. биол. наук Коваль О. А.

А.А.Фролова¹, И.Ю.Филатова², К.М. Скулкина³

¹Тульский государственный университет

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушино

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
ali.frolowa@yandex.ru

РОЛЬ ЗАМЕЩЕННЫХ САЛИЦИЛАТОВ В МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ИХ ДЕГРАДАЦИИ

На настоящий момент ведущее значение в разложении большинства полиароматических углеводов отводится микроорганизмам, так как все основные реакции детоксикации или частичной химической модификации ксенобиотиков связаны с их метаболической активностью.

Деграцию нафталина, как простейшего представителя ПАУ, рассматривают вкуче с деградацией ключевого интермедиата и активатора генов его катаболизма - салицилата. В штамме *Pseudomonas putida* AK5 обнаружена плазмида рAK5, на которой располагаются два регуляторных белка NahR и SgpR, оба белка относятся к LysR-семейству и гомологичны друг другу на 63%. Экспериментально доказано, что белок SgpR является регулятором гена *sgpA*. Однако, исходя из литературных данных, NahR также участвует в регуляции экспрессии генов деградации салицилата. Для исследования NahR на предмет участия в регуляции *sgp*-оперона использовали созданные ранее *fusion*-конструкции, где в качестве репортерного гена выступал ген *lacZ* под контролем регуляторной области *sgp*-оперона. При введении NahR в качестве регулятора активность продукта в присутствии и в отсутствии индуктора (салицилата натрия) находилась на уровне образцов, где вообще отсутствует регуляторный белок.

Часто в литературе потенциал микроорганизмов к биоремедиации оценивают исключительно по субстратной

специфичности ферментов биодegradации. Так, например, в почве салициловая кислота находится преимущественно в замещенной форме, следовательно, все регуляторные участки будут адаптированы к определенным производным. Бактерии способны трансформировать салицилат по трем биохимическим путям, в результате чего в некоторых случаях ряд замещенных салицилатов будет превращаться в токсичные для клетки метаболиты. Поэтому для успешной конкуренции необходимо тонко регулировать все возможные пути, приводящие к гибели клетки.

Изменение уровня экспрессии генов деградации салициловой кислоты штамма *P. putida* AK5 (конверсия через гентизиновую кислоту) и штамма G7 (конверсия через катехол и далее его расщепление по орто-пути) в условиях индукции различными производными салицилата определяли методом ОТ-qPCR с применением специфичных праймеров. Для штамма AK5 максимальное накопление продукта происходит при индукции салицилатом натрия, также увеличивают экспрессию 4;5-метилсалицилат, 3;5-хлорсалицилат. При индукции гентизатом уровень экспрессии сравним с контролем в отсутствии индуктора, а при добавлении 5-аминосалицилата происходит ингибирование транскрипции. Для штамма G7 значительное увеличение экспрессии происходит при индукции 3;5-хлорсалицилатом, салицилатом и 4-метилсалицилатом. Не вызывает изменений гентизат и 5-метилсалицилат, а добавление 5-аминосалицилата аналогично штамму AK5 приводит к ингибированию экспрессии генов. Полученные данные показывают различия в индукторах разных биохимических путей деградации салицилата, а исследование этой взаимосвязи поможет разрабатывать эффективные биопрепараты для очистки различных объектов от загрязнений.

Научный руководитель – М.В. Захарова, канд. биол. наук.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ
ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ СТРУКТУР КИШЕЧНОПОЛОСТНЫХ
В ПРОЦЕССЕ МЕТАМОРФОЗА НА ПРИМЕРЕ
*AURELIA AURITA (CNIDARIA: SCYPHOZOA)***

Изучение развития светочувствительных органов представителей базальных групп Metazoa важно в связи с выдвигаемыми гипотезами о происхождении зрения в ходе эволюции. Особый интерес вызывают исследования особенностей фоторецепции кишечнополостных, так как эти животные обладают широким морфологическим разнообразием зрительных органов. Это могут быть одиночные фоторецепторные клетки (в группе Anthozoa), развитые в разной степени пигментные бокалы (у Hydrozoa и Scyphozoa) или же камерные глаза, схожие по строению с глазами позвоночных животных (в группе Cubozoa). При этом ключевые гены, ответственные за регуляцию дифференциации фоторецепторов и вспомогательных структур у Cnidaria являются гомологами таковых у Bilateria.

Наша работа посвящена изучению молекулярных механизмов развития светочувствительных органов *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). Эти животные обладают сложным жизненным циклом, в котором чередуются стадии полипов, лишенных обособленных глаз, и стадии медуз, имеющих глаза, устроенные по типу пигментного пятна и пигментного бокала. Часть этого жизненного цикла, а именно переход от полипоидной к медузоидной стадии, была реализована в лабораторных условиях. Это позволило нам описать характер экспрессии некоторых генов, связанных с фоторецепцией.

В результате поиска в геноме и транскриптоме *A. aurita* было выявлено наличие нескольких генов фоторецепторных белков -

опсинов. Нам удалось проследить их экспрессию на различных стадиях жизненного цикла. Также, нами были выявлены последовательности генов, участвующих в регуляции развития фоторецепторных и пигментных клеток: *eyesabsent* и гены семейства *Six*. При помощи метода РНК гибридизации *in situ* нами была выявлена смена паттерна экспрессии этих регуляторных генов в ходе метаморфоза полипа и образования молодых медуз. Полученные данные свидетельствуют о том, что гены *eyesabsent*, *Six 1/2* и *Six6*, по всей видимости, принимают участие в регуляции раннего развития зрительных органов *Aurelia aurita* сходно с тем, как это происходит у представителей Bilateria.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00593 А, а также гранта СПбГУ № 1.40.496.2017. Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ Развитие молекулярных и клеточных технологий.

Научный руководитель – В. В. Старунов, канд. биол. наук, с.н.с.

УДК 576.32/.36

А. В. Хохлова, С. Н. Ворсина, Д. А. Лямина
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»
avhohlova@gmail.com

ОБЛУЧЕНИЕ ЛАЗЕРОМ НИЗКОЙ МОЩНОСТИ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 1265 НМ ОКАЗЫВАЕТ ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

В настоящее время широкое применение получила фотобиомодуляционная терапия раковых заболеваний, предполагающая использование лазерного излучения низкой мощности; при этом акцептором являются биологические молекулы внутри самих клеток. На данный момент наиболее изучено воздействие лазеров с диапазоном 600-1070 нм. При этом ряд исследований показывает, что длины волн 1265-1270 нм также оказывают широкий спектр влияний на

биологические объекты. Механизм такого воздействия во многом ассоциирован с усилением продукции активных форм кислорода (АФК). В связи с этим, важным представляется изучить эффекты, которые позволят предположить локализацию акцептора лазерного излучения низкой мощности.

Объектом исследования выступила культура раковых клеток НСТ-116. Культивирование проводилось в условиях, рекомендованных АТСС (American Type Culture Collection). Для облучения использовался лазер Yenista Optics Osics (T100) в диапазоне длин волн 1260-1275 нм и средней мощностью излучения 4 мВт. Определялся уровень АФК, митохондриальный потенциал, митохондриальная масса, уровень GSH, механизмы клеточной смерти с применением микроскопа Nikon Eclips Ti (красители: DCFH-DA, TMRE, NAO, MCB, Yo-Pro1 iodide, propidium iodide), а также выживаемость при помощи анализа клоногенности. Уровень повреждений ДНК определялся с помощью qPCR (амплификатор BIO-RAD CFX96). Все эксперименты выполнялись трехкратно. Статистическая обработка проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

В результате исследования было показано, что облучение лазером с длиной волны 1265 нм вызывает наибольшее воздействие на повышение уровня АФК. Уровень митохондриального потенциал снижался сразу после облучения по сравнению с контрольной группой, и восстанавливался не раньше, чем через 3 часа. Снижение митохондриальной массы после воздействия можно связать с окислением кардиолипина, восстановленная форма которого специфически окрашивается NAO. Уровень апоптоза и некроза достоверно увеличивался через 24 часа после облучения. Также через 7 дней в опытных группах уменьшалась способность образовывать колонии, что говорит о негативном влиянии на выживаемость облучённой культуры в целом. Нами было показано, что облучение

лазером с длиной волны 1265 нм вызывает повреждение митохондриальной ДНК, но не оказывает влияние на ядерную.

Таким образом, использование лазерного излучения низкой мощности позволяет изучить воздействие длины волны на внутриклеточные процессы, минимизируя эффект нагревания, который является значительным препятствием в случае применения высокомоощных лазеров. Нами показано, что основное воздействие локализовано в области митохондрий, вызывая окислительные повреждения близлежащих структур и нарушая их функционирование. Последующие исследования могут быть направлены на уточнение механизма влияния лазерного излучения с длиной волны 1265 нм и изучения потенциала его применения в терапии поверхностных новообразований.

Научный руководитель - д.б.н., Ю.В. Саенко.

УДК 577.21

А.М. Хусаинов, Л.Л. Фролова
Казанский федеральный университет
shade0602@yandex.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МОДЕЛЬ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГИДРОБИОНТОВ ПО МАРКЕРНЫМ БЕЛКАМ

Известно, что одним из высокоинформативных способов экологической оценки окружающей среды является использование метода биоиндикации, то есть выявление неспецифической реакции живых организмов на изменение условий среды их обитания, например – загрязнение или очищение. На основе метода биоиндикации оценивают экологическое состояние окружающей среды, в том числе водных объектов путем изучения обитающих в исследуемой среде видов-индикаторов, определяемых до настоящего времени визуально с помощью микроскопа с извлечением каждого организма из пробы воды. В качестве альтернативы мы предложили использовать метод

идентификации и характеристики совокупности гидробионтов в пробе воды по маркерным белкам, например, CO1 – для животных, rbcL – для растений и ITS – для грибов.

В данной работе показана экспериментальная модель идентификации гидробионтов по маркерным белкам для оценки сапробности трех озер Кабан на территории г.Казани. Моделирование проведено на основе оценки содержания в модельных пробах бактериальных белков, условно принятых соответствующими маркерным белкам гидробионтов. Оценка содержания белков в пробе проведена на основе метода иммуноблоттинга и последующего анализа интенсивности свечения белковых полос для расчета относительного количественного состава в пробе.

Для верификации модели идентификации гидробионтов по белкам мы сопоставили белки CO1 организмов из отобранных проб озер Кабан г.Казани модельным белкам TnrA, GlnK и GS, полученным в ходе эксперимента: CO1 *Brachionus calyciflorus* (бетамезосапробный) – TnrA, CO1 *Daphnia pulex* (полисапробный) – GlnK и CO1 *Kellicottia longispina* (олигосапробный) – GS, в качестве антител использовали готовые антитела α TnrA, α GlnK и α GS против белков TnrA, GlnK и GS, провели анализ концентрации белков в пробе методом иммуноблоттинга и дали относительную полуколичественную оценку особей в пробе.

По итогам исследования, полученные экспериментальные данные на основе молекулярной модели идентификации гидробионтов по маркерным белкам, полностью совпадают с ожидаемыми результатами и соответствуют оценке экспертов по экологическому состоянию водоемов Кабан по методу биоиндикации.

Новый подход к идентификации гидробионтов по маркерным белкам с использованием современных методов биоинформатики и молекулярной генетики позволит сотрудникам природоохранных органов быстро получить точную информацию о популяции водоема, и, следовательно, дать достоверную своевременную оценку экологическому состоянию водоема.

Научный руководитель – Л.Л. Фролова, канд. техн. наук, доцент.

УДК 578.282

Е. С. Челарская¹, Д. С. Карпов², А. А. Куш³

¹ *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К. И. Скрябина*

² *Институт молекулярной биологии им. В. Э. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва*

³ *«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва
katerina.chelarskaya@yandex.ru*

ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА ПРИ ПОМОЩИ CRISPR-CAS СИСТЕМЫ

Вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1) из семейства Herpesviridae, вызывающий везикулярные поражения кожных покровов и слизистых оболочек, при ослабленном иммунитете может приводить к серьёзным заболеваниям вплоть до летального исхода, представляя серьёзную медико-социальную проблему. Через нервные окончания вирус проникает в нейроны сенсорных ганглиев, где переходит в неактивную латентную фазу. Механизмы реактивации вируса до конца не ясны, одной из причин может быть снижение активности иммунной системы. Существующие на сегодняшний день химические препараты для борьбы с инфекцией, вызываемой ВПГ-1, подавляют только репликативную активность вируса и не способны действовать на его латентную форму.

Недавно проведены первые успешные эксперименты по подавлению герпесвирусной инфекции с помощью бактериальной системы редактирования генома - CRISPR/Cas9. Ключевыми компонентами этой системы являются направляющая РНК, содержащая участок, комплементарный целевому участку редактируемого генома, и РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза Cas9. Cas9 в комплексе с направляющей РНК находит целевой участок генома и вносит внутри него двухцепочечный разрыв ДНК. При использовании направляющей

РНК, комплементарной одному или нескольким участкам ДНК ВПГ-1, происходит частичное или полное выключение участков вирусного генома, ответственных за репликацию вируса. Таким образом, CRISPR/Cas9 система рассматривается как альтернативный способ борьбы с герпесвирусными инфекциями.

В настоящей работе мы использовали CRISPR/Cas9 систему для подавления герпесвирусной инфекции в модельной клеточной системе на основе клеток Vero.

УДК 579.258

Л.С. Чернова, М.Н. Рыжикова

Казанский федеральный университет

LSCh-888@live.com

ГИПЕРПРОДУКЦИЯ ПРОТЕАЗЫ HTRA СПОСОБСТВУЕТ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК *BACILLUS SUBTILIS* В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА И ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНКИ

HtrA (high temperature requirement A) – индуцируемые тепловым шоком сериновые протеиназы. В клетках про- и эукариот эти ферменты осуществляют качественный белковый контроль гидролизуя денатурированные белки, тем самым предохраняют клетки от последствий различных стрессов. У многих микроорганизмов они являются фактором патогенности. Для стрептококков показано участие фермента в кворум-зависимых процессах и образовании биопленки. Целью данной работы являлось оценить значение протеиназы HtrA в образовании биопленки клетками *Bacillus subtilis*.

Нами был получен штамм *Bacillus subtilis* HtrA Ну обеспечивающий гиперпродукцию белка HtrA. С помощью дифференциального флюоресцентного окрашивания мертвых и живых клеток и подсчета КОЕ было показано, что повышенное содержание белка HtrA привело к повышению жизнеспособности клеток штамма *B. subtilis* при температуре свыше 60 °С в 6 раз по сравнению с контрольным штаммом. Также было обнаружено различной степени

роение колоний клетками *B. subtilis* с гиперпродукцией белка. Окрашиванием кристаллическим фиолетовым и конфокальной лазерной сканирующей микроскопией обнаружена способность штаммов с гиперпродукцией протеиназы образовывать более плотные биопленки. Оценку синтеза внеклеточного матрикса проводили окрашиванием колоний красителем Конго Красный. Колонии клеток штамма *Bacillus subtilis* HtrA Ну характеризовались красным окрашиванием, что свидетельствовало о синтезе в матриксе амилоидов, а толщина окрашенной красителем колонии была в 1,5 раза больше, чем у исходного штамма. Чтобы установить влияние HtrA на уровень экспрессии оперонов, участвующих в синтезе внеклеточного матрикса биопленки, были получены рекомбинантные штаммы с репортерными конструкциями *eps-LacZ* и *uqxM-LacZ*. Уровень активности галактозидазы в прикрепленных клетках показал повышенную экспрессию *eps* оперона и гена *uqxM* и образование более плотной биопленки клетками гиперпродуцента HtrA.

Таким образом, повышенный синтез HtrA значительно повышает жизнеспособность клеток бацилл в условиях теплового стресса, способствует образованию биопленки клетками бацилл и синтезу компонентов ее внеклеточного матрикса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект №15-14-00046).

Научный руководитель- А.Р. Каюмов, кандидат биол. наук, доцент.

УДК 577.29

А.А. Шенфельд, М.Е. Велижанина, Т.А. Рыжова, Ю.В. Сопова,

А.П. Галкин

Санкт-Петербургский государственный университет

shenaleksandr@mail.ru

АНАЛИЗ АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВ ФРАГМЕНТА БЕЛКА NSF(248-463) КРЫСЫ *RATTUS NORVEGICUS*

Амилоидами называют белки, формирующие бета-складчатые фибриллы. Изучение амилоидных белков является одним из приоритетных направлений современной биомедицины, поскольку

накопление патологических амилоидных агрегатов в тканях человека ассоциировано с большим перечнем заболеваний, именуемых амилоидозами. Помимо патологических существуют также и функциональные амилоиды, которые принимают участие в поддержании физиологически значимых процессов.

В нашей работе мы провели поиск ранее не охарактеризованных функциональных амилоидов в мозге молодых самцов крысы *R. norvegicus*. Протеомный скрининг проводился с помощью разработанной в нашей лаборатории методики, нацеленной на выявление в протеоме белков, формирующих детергент-устойчивые агрегаты. Устойчивость к ионным детергентам является универсальным свойством амилоидных фибрилл. В результате протеомного скрининга в мозге крысы был выявлен ряд белков, формирующих детергент-устойчивые агрегаты, среди которых был NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein). Данный белок участвует в контроле везикулярного транспорта – процесса, лежащего в основе нейротрансмиссии. Биоинформатический анализ выявил два потенциально амилоидогенных региона в аминокислотной последовательности данного белка. Для подтверждения амилоидогенности одной из выявленных последовательностей NSF мы использовали бактериальную систему C-DAG. Данная тест система основана на продукции и экскреции во внеклеточное пространство бактериями *E.coli* интересующего белка, слитого с N-терминальным сигнальным пептидом (CsgA). В нашей работе для анализа был взят амилоидогенный фрагмент белка NSF(248-463). Колонии клеток, продуцирующие NSF(248-463), выращивали на среде, содержащей амилоид-связывающий краситель Congo Red (CR). Эти клетки, в отличие от клеток не продуцирующих исследуемый белок, окрашивались в красный цвет за счёт связывания амилоид-специфичного красителя CR. С помощью поляризационной микроскопии мы показали, что материал из культуры, экскретирующей NSF(248-463), демонстрирует двойное лучепреломление и окрашивается в яблочно-зелёный цвет, что

характерно для амилоидных фибрилл. Электронная микроскопия подтвердила наличие амилоидоподобных фибрилл в анализируемом образце.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что NSF обладает амилоидными свойствами *in vivo*. Далее планируется подтвердить амилоидную природу полноразмерного белка. На основании присутствия данного белка во всех анализируемых образцах, а также амилоидных свойств фрагмента 248-463 ак. можно предположить, что NSF является кандидатом в функциональные амилоиды мозга млекопитающих.

Научный руководитель – А.П. Галкин, д-р биол. наук.

УДК 602.6:58

А.Д. Юрина^{1,2}, Н.Е. Злобин¹, В.В. Таранов¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, г. Москва*

² *Российский государственный аграрный университет — МСХА
им. К. А. Тимирязева, г. Москва*
anzhelikamolbiol@gmail.com

ФАКТОР ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ELF4E КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ К ВИРУСУ Y

Вирус Y картофеля (PVY) типичный представитель рода Potyvirus. PVY - один из самых вредоносных вирусов, поражающих картофель, при этом он поражает и другие культуры сельскохозяйственные культуры семейства Solanaceae (томат, перец). Поскольку вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, они полностью полагаются на трансляционный аппарат клетки хозяина для производства вирусных белков и завершения инфекционного цикла. Трансляция РНК потивируса требует

взаимодействия белка VPg, находящегося на 5' конце вирусной РНК и белка eIF4E, связывающегося с кэп-структурой мРНК.

Эукариотический фактор инициации трансляции eIF4E является важным фактором чувствительности к вирусу Y. Ранее обнаруженные растения из семейства Solanaceae, имеющие устойчивость к PVY, имели несинонимичные замены в кодирующих областях гена eIF4E. Подобные мутации приводили к потере взаимодействия с белком VPg, но в то же время не влияли на участие белка в трансляционном механизме растения.

Использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 Target-AID позволяет создать вирусоустойчивость у табака и картофеля. Новая технология Target-AID позволяет производить целевую замену нуклеотидов в геноме растений при помощи цитидин дезаминазы. Мы проанализировали последовательности генов резистентности и выявили полиморфизмы, связанные с изменением аминокислот в кодируемом белке. Затем мы выявили кодоны, подходящие для редактирования цитидин дезаминазой. Подобранные замены потенциально приведут к появлению устойчивости к вирусу Y у восприимчивых растений.

Научный руководитель - В.В. Таранов, канд. биол. наук.

УДК 575.224.6

И.Р.Ягудина¹, С.К. Гумерова², Н.С. Карамова³

Казанский федеральный университет

ilyuza.yagudina@mail.ru

АНТИГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ *P. SANSEVIERIA* В UMU-ТЕСТЕ

Поиск природных веществ, обладающих антигенотоксической активностью, является актуальным при создании препаратов для профилактики и терапии различных хронических заболеваний.

Целью настоящей работы явилась оценка влияния экстрактов растений р. *Sansevieria* на индуцированный SOS-мутагенез в клетках бактерий *Salmonella typhimurium* 1535/pSK1002 в Umu-тесте.

Органические экстракты корневищ и листьев растений *Sansevieria trifasciata* и *Sansevieria cylindrica* были приготовлены с использованием метанола (100 г растительного материала: 1 л 80% метанола). В Umu-тесте использованы растворы сухого остатка метаноловых экстрактов растений в стерильной дистиллированной воде. В качестве известных генотоксических веществ использованы бихромат калия (300 мкг/мл) и налидиксовая кислота (100 мкг/мл).

Установлено, что растительные экстракты во всех исследованных концентрациях не проявляют генотоксический эффект в Umu-тесте.

Как в отношении бихромата калия, так и налидиксовой кислоты, нами обнаружен дозозависимый антигенотоксический эффект экстрактов растений *S. trifasciata* и *S. cylindrica*. Экстракты *S. trifasciata* эффективнее подавляли индуцированный SOS-ответ, причем именно экстракт корневищ растений обладал более высокой дозозависимой антигенотоксической активностью, чем экстракт листьев. Следует также подчеркнуть, что для всех исследованных экстрактов эффект более выражен в отношении бихромата калия, чем налидиксовой кислоты. По всей вероятности, исследованные растительные экстракты в основном ингибируют окислительные повреждения ДНК.

Научный руководитель – Н.С. Карамова, канд. биол. наук.

УДК. 612.816.7

И. А. Акутин

Московский государственный университет

VanoAkutin@gmail.com

МЕХАНИЗМ УВЕЛИЧЕНИЯ РАЗМЕРА КВАНТА АЦЕТИЛХОЛИНА ПРИ АКТИВАЦИИ PAR1 РЕЦЕПТОРОВ В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

PAR (proteinase-activated receptors) – это семейство 7-доменных трансмембранных рецепторов, связанных с G-белками. Эти рецепторы активируются сериновыми протеиназами, например, тромбином. Установлено, что в моторных синапсах мыши PAR1 локализованы на постсинаптической мембране. В экспериментальной практике для активация данных рецепторов используются короткие пептиды-агонисты (TRAP), имитирующие N-концевую сигнальную последовательность PAR1. Целью работы было исследовать возможные изменения параметров квантовой секреции ацетилхолина (АХ) в зрелых моторных синапсах мыши при действии на них пептида-агониста PAR1 (TRAP6-NH₂).

Эксперименты проводились на нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши с использованием стандартной микроэлектродной техники. Регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и одиночные (частота стимуляции нерва - 0.3 Гц) вызванные потенциалы концевой пластинки (ПКП). Анализировали амплитудно-временные характеристики МПКП и ПКП, частоту МПКП, квантовый состав ПКП.

При аппликации TRAP6-NH₂ (1 мкМ) на нервно-мышечный препарат в течение 60 минут происходило достоверное увеличение амплитуд МПКП на 25-30% по сравнению с контрольными значениями, при это остальные характеристики МПКП не изменялись. Интересно, что при отмывке нервно-мышечного препарата от TRAP6-

NH₂ значение амплитуд МПКП устойчиво сохранялось на повышенном по сравнению с контролем уровне. При изучении вызванной секреции АХ оказалось, что TRAP6-NH₂ параллельно увеличивал амплитуду МПКП и ПКП на 25%, при этом квантовый состав ПКП не изменялся. Таким образом, в нервно-мышечном синапсе мыши усиление вызванной секреции АХ при активации PAR1 происходит за счёт увеличения размера отдельных квантов в составе мультиквантового ПКП. Прирост амплитуд МПКП предотвращался на фоне ингибирования везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ), что говорит нам о том, что активация PAR1 в конечном итоге вызывает увеличение размера кванта на пресинаптическом уровне.

Важно было понять, какую систему вторичных посредников запускает активация PAR1. Известно, что PAR1 может быть связан с Gq-белком, активирующим фосфолипазу C (PLC). TRAP6-NH₂ утрачивал способность увеличивать амплитуду МПКП на фоне блокатора PLC U73122 (5 мкМ). Результаты этой серии экспериментов свидетельствуют об участии PLC в сигнальном каскаде, запускаемом активацией PAR1.

Для изучения возможной ретроградной сигнализации при активации PAR1 использовался блокатор TrkB рецепторов нейротрофинов – ANA12(10мкМ), преапликация которого предотвращала прирост амплитуды МПКП вызванный действием TRAP6-NH₂. Апликация BDNF (1 пМ) в качестве экзогенного агониста TrkB рецепторов приводила к увеличению амплитуды МПКП на 20% по сравнению с контролем. Совокупность полученных данных свидетельствует о возможном участии BDNF в сигнальном каскаде, запускаемым при PAR1 рецепторов.

В заключение следует отметить, что проведенное нами исследование эффектов пептида-агониста PAR1 в нервно-мышечных синапсах мыши впервые выявило ряд участников сложного сигнального каскада, локализованного в разных частях синапса, и приводящего к значительному облегчению спонтанной и вызванной секреции за счет прироста размера кванта АХ.

Научный руководитель – А. Е. Гайдуков доцент: канд. биол. наук.

В.О. Атолагбе

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

atolz27@gmail.com

ВЛИЯНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫХОДЯЩИЕ КАЛИЕВЫЕ ТОКИ В КУЛЬТУРЕ GH3 КЛЕТОК КРЫСЫ

Уксусная кислота - одноосновная кислота, промежуточное производное метаболизма этанола, а также углеводов и жиров и ацетилхолина. Показаны эффекты уксусной на сердечно-сосудистую систему, где она вызывает вазорелаксацию и увеличивает уровень цАМФ. Кроме того, было предположено, что уксусная кислота опосредует эффекты этанола в центральной нервной системе, такие нарушения двигательного контроля. Одной из мишеней действия этанола в возбудимых тканях являются Ca-активируемые K каналы большой проводимости (BK-каналы), однако, эффекты уксусной кислоты на активность данных каналов не была показана. Целью работы было изучение влияния уксусной кислоты на активность BK-каналов в GH3 клетках гипофиза крысы.

Эксперименты проводились с использованием культуры гипофизарных клеток крысы GH3. Клетки культивировались при температуре 37°C и влажности 90% в растворе MEM (*Minimal Essential Medium*), дополненным 7% FCS (*fetal calf serum*) и 3% HS (*horse serum*). Для экспериментов клетки растили в чашках Петри на покровных стеклах, покрытых *poly-D-lysine*. Регистрацию электрических ответов проводили на 3-4 дни после высаживания. Патч-пипетки изготавливались из боросиликатного стекла (*Harvard Apparatus*) и имели сопротивление 3-6 МОм. Регистрация в режиме whole cell проводилась с использованием усилителя Axopatch-200B с использованием программы Clamp10 (*Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*). Для

регистрации выходящих К-токов на клетку подавали потенциалы, начиная с -80 мВ до +140 мВ с интервалом 20 мВ. Внутрипипеточный раствор содержал 0.5 мкМ свободного Ca^{2+} , что обеспечивало активацию ВК-каналов. В экспериментах использовали уксусную кислоту (0.02%), тетраэтиламмоний (ТЕА, 1 мМ).

Уксусная кислота в концентрации 0,02% приводила к значительному увеличению амплитуды выходящих калиевых токов, между потенциалами +40-60 мВ, и эти токи достоверно снижались при последующей аппликации ТЕА, что указывает на активацию ВК-каналов при действии уксусной кислоты. Для выявления роли закисления внеклеточной среды в эффектах уксусной кислоты использовали внеклеточный раствор с рН= 5.7, соответствующий рН раствора уксусной кислоты в концентрации 0.02%. Оказалось, что аппликация раствора с низким рН не приводит к изменениям выходящих К-токов. Таким образом, уксусная кислота, эндогенный метаболит этанола, вызывает усиление выходящих К-токов в культуре ГНЗ клеток крысы и может опосредовать клеточный эффекты этанола в различных тканях.

Научный руководитель - д-р биол. наук, зав.каф. Ситдикова Г.Ф

УДК 612.832

Л.М. Бикчентаева, Э.И. Ямалитдинова, А.Д. Милицкова

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

leysanbm@mail.ru

ПАРАМЕТРЫ МОТОРНЫХ ОТВЕТОВ МЫШЦ ГОЛЕНИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЧРЕСКОЖНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СЕГМЕНТОВ СПИННОГО МОЗГА

Известно, что чрескожная электрическая стимуляция поясничного утолщения спинного мозга вызывает моторные ответы с мышц нижних конечностей, однако параметры данных ответов в

зависимости от локализации стимуляционного воздействия изучены недостаточно. Целью исследования явилось изучение параметров мышечных ответов, вызываемых чрескожной электрической стимуляцией различных сегментов спинного мозга у здоровых испытуемых (n=10). Регистрировали вызванные потенциалы (ВП) камбаловидной (SOL) и передней большеберцовой (ТА) мышц на чрескожную электрическую стимуляцию спинного мозга (ЧЭССМ) на трех уровнях: Th10-11, Th11-12 и Th12-L1. Стимуляция осуществлялась прямоугольными одиночными электрическими импульсами длительностью 1 мс, интенсивность от 0 до 100 мА. С целью предотвращения следовых эффектов пауза между импульсами составляла не менее 15 с.

В составе многокомпонентного вызванного потенциала голени мы выделили два компонента – ранний (ER) и средний (MR), поздний (LR) компонент отсутствовал. Известно, что ранний компонент является результатом активации двигательных аксонов, а средний является аналогом рефлекторного ответа. Поздний компонент обычно не вызывается у здоровых испытуемых в положении лежа. Его, как правило, можно наблюдать при стимуляции в положении стоя, при генерации шагательных движений или у пациентов со спинальной патологией. В целом, порог MR был ниже, чем для ER при всех уровнях стимуляции, что согласуется с представлениями других авторов, которые показали, что при низкой интенсивности ЧЭССМ происходит преимущественное вовлечение низкопороговых афферентных волокон и слабым рекрутированием моторных аксонов, а при увеличении интенсивности стимула нарастает число активированных двигательных аксонов. Нами были построены усредненные кривые рекрутирования вызванных ответов мышц голени на стимуляцию спинного мозга на уровне Th10-11, Th11-12 и Th12-L1: при увеличении силы стимуляции наблюдалось увеличение амплитуды как раннего, так и среднего компонента ответов. В диапазоне интенсивности стимула от 30 до 100 мА максимальная

амплитуда среднего компонента вызванных потенциалов SOL и ТА была больше, чем раннего при стимуляции спинного мозга на всех уровнях. При сравнении амплитуды ответов на чрескожную электрическую стимуляцию различных сегментов спинного мозга оказалось, что величина ответов мышц голени на ЧЭССМ на уровне Th11-12 была больше, чем при стимуляции на уровнях Th10-11 и Th12-L1 ($p < 0,05$). При стимуляции на этом уровне амплитуда раннего компонента ответа SOL в среднем составила $2,23 \pm 0,53$ мВ, амплитуда среднего компонента ответа $-4,65 \pm 1,97$ мВ, для ТА значения составили в среднем $0,48 \pm 0,18$ и $0,89 \pm 0,17$ мВ, соответственно. Таким образом, чрескожная стимуляция спинного мозга с помощью накожных электродов, расположенных между остистыми отростками Th11-12 грудных позвонков является оптимальной для активации мышц голени у человека. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-20036).

Научный руководитель - Г.Г. Яфарова, асс., канд. биол. наук., И.А. Лавров, с.н.с., канд. мед. наук.

УДК 612.171.1

А. С. Блохина, Н. Н. Хаертдинов

Казанский федеральный университет

las911@rambler.ru

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ОТРИЦАТЕЛЬНОМ ИНОТРОПНОМ ЭФФЕКТЕ СЕРОВОДОРОДА В ПРЕДСЕРДИЯХ МЫШИ

Сероводород (H_2S) и оксид азота (NO), газы, долгое время известные только своей токсичностью, теперь признаны в качестве важных регуляторов многих физиологических функций в сердечно-сосудистой, нервной, желудочно-кишечной, дыхательной системах. Субстратом эндогенного синтеза H_2S является серосодержащая аминокислота L-цистеин из которой газ образуется с участием трех

ферментов: цистатионин-β-синтазы (ЦБС), цистатионин-γ-лиазы (ЦГЛ) и 3-меркаптосульфотрансферазы (3-МСТ). В образовании NO участвуют три изоформы NO синтазы (NOS): эндотелиальная (eNOS), индуцибельная (iNOS) и нейрональная (nNOS), субстратом синтеза служит L-аргинин. Будучи газообразными посредниками H₂S и NO обладают способностью свободно диффундировать через клеточные мембраны, опосредуя свои эффекты через изменение активности ионных каналов и внутриклеточные посредники. В 2009 году появились, экспериментальные доказательства, перекрестного взаимодействия между H₂S и NO. В сердечно-сосудистой системе при совместном взаимодействии они способны защитить сердце от ишемических нарушений. Ингибирование образования NO значительно ослабляет кардиопротекторные эффекты H₂S. Модулируя экспрессию и активность eNOS и iNOS H₂S участвует в регуляции образования NO. В свою очередь донор NO приводит к повышению экспрессии ЦГЛ и ЦБС, вследствие чего продукция H₂S в тканях крыс увеличивается. Целью нашего исследования было изучение вклада AX-рецепторов в отрицательный инотропный эффект H₂S в предсердиях мыши.

Эксперименты по регистрации сократимости проводились на предсердиях белых лабораторных мышей. После препаровки предсердия одним концом прикреплялись к тензодатчику (MLT 050/D) другим к фиксирующему блоку и погружались в ванночку объемом 20 мл с раствором Кребса. Стимуляция осуществлялась через два кольцевых электрода с частотой 0.1 гЦ. Регистрация и запись осуществлялась на установке BiopacSystemsInc., USA при помощи программы Elph_4p0. В экспериментах были использованы следующие вещества: гидросульфид натрия (NaHS), N_ω-Nitro-L-argininemethylesterhydrochloride (L-NAME) и S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP).

В качестве донора H₂S был использован NaHS, который оказывал дозозависимый отрицательный инотропный эффект. В качестве рабочей концентрации NaHS было выбрано 300 мкМ. Контрольные

эксперименты проводились для каждой серии отдельно. Блокирование синтеза NO при помощи неселективного блокатора L-NAME 200 мкМ не привело к достоверному изменению силы сокращения предсердий. При этом отрицательный инотропный эффект NaHS на фоне L-NAME составил $44 \pm 3 \%$ ($n=6$; $p < 0.05$), что не отличается от эффекта NaHS в контроле для этой серии экспериментов ($38 \pm 1 \%$, ($n=4$; $p < 0.05$)). Добавление донора NO SNAP 80 мкМна силу сокращения предсердий не повлияло и отрицательный инотропный эффект NaHS на фоне SNAP полностью сохранялся ($32 \pm 4 \%$ ($n=8$; $p < 0.05$)) и не отличался от контрольных значений для данной серии ($24 \pm 2 \%$ ($n=6$; $p < 0.05$)).

Возможно в миокарде предсердий мыши NO не участвует в эффектах H_2S , либо ее роль незначительна. Кроме того, ни неспецифичный блокатор NOSни донор NO не приводили к изменению силы сокращений, что может свидетельствовать об отсутствии существенной роли NO в регуляции сократимости предсердного миокарда мыши.

Научный руководитель - Г. Ф. Ситдикова, д-р биол.наук, проф.

УДК.612.01:591.1

С.А. Бриллиант^{1,2,3}, И.А. Шадрин²

¹*Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург*

²*Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина*

³*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург*

svetlana.brilliant@bk.ru

ИЗМЕНЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНОВОГО ПРОФИЛЯ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ ОСТРОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

В настоящее время известно, что изменение гемоглобинового профиля крови при экстремальных воздействиях на организм связано с изменением соотношения между отдельными популяциями

эритроцитов, различающихся по содержанию отдельных изоформ. Однако, изменения соотношения изоформ костного мозга при действии на организм экстремальных факторов остается мало изученным.

В связи с этим, нами была поставлена цель - изучить изменения гемоглобинового профиля костного мозга у крыс при развитии острой воспалительной реакции, и сопоставить с изменениями, происходящими в периферической крови.

Эксперимент выполнен на 30 крысах массой 250-300г. Острое локальное воспаление вызывали путем введением под кожу спины скипидара в количестве 0,5 мл. Все животные были поделены на 3 группы. Первая группа служила контролем. Забор материала у животных 2-ой и 3-ей групп осуществляли спустя 6 ч и 2 сут после инициирования воспалительного процесса. Для определения соотношения белковых фракций гемоглобина крови и костного мозга использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по методу Г. Маурера. Статистическая обработка данных проводилась при помощи программ «Microsoft Excel» и «STATISTICA 8.0» непараметрическим критерием Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты исследований показывают, что спустя 6 ч в периферической крови снижается содержание 1 и 2 белковых фракций за счет увеличения количества 5 и 6 изоформ, благодаря которым обеспечивается перенос большего количества кислорода к месту воспаления. На 2 сут резко повышается содержание гемоглобинов 3 и 4 фракций за счёт уменьшения содержания гемоглобина 1, 2, 5 и 6 фракций, что указывает на усиление компенсаторных механизмов в ответ на развитие воспалительной реакции в организме. В костном мозге наблюдается резкое снижение доли гемоглобина 1 и 2 белковых фракций, за счёт увеличения содержания 3 и 6 изоформ гемоглобина. Через 2 сут количество гемоглобина 2 фракции поднимается до уровня интактных животных. Уровень гемоглобина 4 и 6 изоформ гемоглобина становится выше нормального за счет резкого уменьшения гемоглобина 3 белковой фракции.

Таким образом, при развитии воспалительной реакции на раннем сроке наблюдаются выраженные изменения гемоглобинового профиля костного мозга, характеризующиеся значительным ростом 3,4 белковых фракций гемоглобина за счет снижения 1,2 и 6 белковых форм. На позднем сроке уровень 4 и 6 белковых фракций продолжает возрастать, что свидетельствует о наработке молодых клеток с последующим их выходом в кровоток. В периферической крови содержание 1 и 2 белковых фракций гемоглобина снижается за счет увеличения количества гемоглобина 5 и 6 изоформ. 5 и 6 фракции гемоглобина крыс являются физиологическим эквивалентом фетального гемоглобина и участвуют в переносе большего количества кислорода к очагу воспаления.

Научный руководитель - Б.Г. Юшков, Проф., д-р.мед.наук, Чл.-корр. РАН

УДК 612.825.1

Г. Ф. Бурханова, К.А. Чернова, Е.В. Герасимова, Г.Ф. Ситдикова

Казанский федеральный университет

gulshat2205@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАСПРОСТРАНЯЮЩЕЙСЯ КОРКОВОЙ ДЕПРЕССИИ У КРЫС

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, которая образуется в процессе метаболизма метионина. Генетические мутации ферментов участвующих в метаболизме гомоцистеина, а также дефицит питательных веществ факторов витамина С0 – (фолиевая кислота, В12 и В6) являются основными причинами возникновения гипергомоцистеинемии (ГГц). Материнская гипергомоцистеинемия является независимым и значимым фактором риска развития осложнений во время беременности, внутриутробной задержки роста и дефектов нервной трубки. Нейротоксичность

гомоцистеина во время пренатального развития может лежать в основе ухудшения нейрогенеза и пластичности развивающегося мозга, долгосрочных нарушениях в обучении и памяти. В некоторых исследованиях у пациентов с мигренью с аурой были показаны высокие концентрации гомоцистеина в плазме.

Целью исследования был анализ чувствительности крыс с пренатальной ГГц к распространяющейся корковой депрессии (РКД).

Эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар в возрасте 6-8 недель. Для исследования была сформирована контрольная группа и опытная, крысы от самок с содержанием в плазме крови большой концентрации гомоцистеина (Гц) (124 ± 23 мкМ). Уровень Гц контрольной группы составила 6.6 ± 0.9 мкМ и ГГц группы – 23.1 ± 3.5 мкМ.

Под изофлурановым наркозом (1.5%) проводилась хирургия с целью обеспечить доступ к соматосенсорной коре. Запись электрической активности коры мозга крыс осуществлялась с помощью 16-ти канального кремниевого зонда, который позволяет регистрировать активность по всей кортикальной колонке в соматосенсорной коре. РКД было вызвано нанесением 10 мкл раствора КСІ в различных концентрациях (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, и 1.0 М).

В группе животных с пренатальной ГГц минимальная концентрация КСІ, вызывающая РКД, составила 0.062 ± 0.008 М ($n=11$), а в контрольной - 0.143 ± 0.036 М ($n=14$). Кроме того, количество и продолжительность РКД волн, вызванные низкими концентрациями КСІ было выше в ГГц группе. При концентрации 0.05-0.1 М КСІ количество РКД в контрольной группе составила 0.45 ± 0.15 ($n=14$) и в ГГц группе - 1.62 ± 0.66 ($n=11$) ($p < 0.05$). Длительность РКД при концентрации КСІ 0.05-0.1 М была значительно дольше в ГГц группе (17.87 ± 1.72 мин) ($n=6$) по сравнению с контрольной группой (0.65 ± 0.003 мин ($n=6$)) ($p < 0.01$). При остальных концентрациях КСІ продолжительность РКД достоверно не отличалась между группами. Горизонтальная скорость

распространения РКД не отличалась в обеих группах и составила 5.1 ± 0.6 мм/мин в контрольной группе и 5.8 ± 0.6 мм/мин – в ГГц группе ($p < 0.05$).

Таким образом, активность коры головного мозга у ГГц и здоровых животных различна в момент возникновения РКД. Низкие концентрации КС1 вызывают больший каскад РКД у больных животных, что свидетельствует о более высокой возбудимости нейронов коры головного мозга у этой группы.

Работа поддержана РФФ №14-15-00618.

Научный руководитель – Е.В. Герасимова, доцент, канд. биол. наук.

УДК 612.825.1

А. Ш. Гайфуллина

Казанский федеральный университет

gayful_a@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА НА АКТИВНОСТЬ Ca²⁺-КАНАЛОВ Т-ТИПА 3.2 ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В TSA-201 КЛЕТКАХ

Увеличение уровня гомоцистеина в крови часто коррелирует с развитием ряда нейродегенеративных заболеваний, и нарушениями в работе нервной системы. Согласно литературным данным, механизм действия гомоцистеина на клетки нервной системы заключается в генерации активных форм кислорода, активации различных киназ/фосфотаз и усилении проводимости НМДА–рецепторов. Для запуска большинства вышеперечисленных реакций требуется наличие ионов Ca²⁺ в клетке. Одним из основных путей поступления Ca²⁺ в клетки является вход через потенциал активируемые Ca²⁺-каналы.

Низкопороговые Ca²⁺-каналы Т-типа играют важную роль при генерации спонтанных спайков, пейсмекерной активности, в сенсорной обработке и нейрональной дифференциации, а также в

развитии таких патологических состояний, как эпилепсии, мигрени и нейропатической боли. Активация каналов при потенциале, близком значениям мембранного потенциала покоя, делает Cav3.2 мишенями действия многих фармакологических агентов

tsA-201 клетки были трансфецированы вектором HA-hCav3.2-GFP с использованием кальций-фосфатной методики. Patch-clamp регистрация Ca^{2+} -токов проводилась на 4 день после трансфекции Патч-пипетки изготавливались из боросиликатного стекла (Havard Apparatus) и имели сопротивление 3-4 МОм. Регистрация в режиме whole cell проводилась с использованием усилителя Axopatch-200B с использованием программы Clamp10 (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Аппликация гомоцистеина в концентрации 300 мкМ в течение 3 минут (острая аппликация) не приводила к достоверным изменениям амплитуды Ca^{2+} -токов Т-типа. Было показано, что аминокислоты и другие высокомолекулярные вещества плохо проникают через мембрану. Исходя из этого, tsA-201 клетки инкубировали в гомоцистеине в концентрации 300 мкМ в течение 24 часов при температуре $37^{\circ}C$ и 5% концентрации CO_2 (хроническая аппликация). Анализ полученных данных показал, что гомоцистеин достоверно увеличивает амплитуду Ca^{2+} -токов. Таким образом, эффект гомоцистеина на Cav3.2 проявлялся в условиях длительной аппликации.

Повышение амплитуды Ca^{2+} -токов Т-типа могло быть результатом усиления экспрессии канальных субъединиц. Чтобы проанализировать, влияет ли хроническая аппликация гомоцистеина на экспрессию Ca^{2+} -каналов Т-типа 3.2 мы измерили общую и поверхностную экспрессию hCav3.2 путем иммуноокрашивания клеток. Анализ данных показал, что при хронической аппликации гомоцистеина 300 мкМ увеличивается количество канальных субъединиц клеточной мембраны на 40%, но не изменяется экспрессия на генном уровне. Увеличение канальных субъединиц на внешней мембране является результатом ингибирования путей интернализации и усиления рециклирования канальных субъединиц.

Регистрация ответов после хронической инкубации клеток в гомоцистеине 300 мкМ с ингибиторами путей интернализации и рециклирования выявило гомоцистеин опосредованную стимуляцию рециклирования канальных субъединиц.

Согласно полученным данным, гомоцистеин увеличивает амплитуду Ca^{2+} -каналов Т-типа за счет усиления рециклирования канальных субъединиц.

Научный руководитель - Г.Ф.Ситдикова, д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных.

УДК 612.821.2

Н. А. Григорьев, А. В. Савосенков, М. В. Лукоянов, С. Ю. Гордлеева

Нижегородский государственный университет

им. Н.И. Лобачевского

kohopadag@gmail.com

СРАВНЕНИЕ ОБРАТНЫХ СВЯЗЕЙ В КОНТУРЕ ИНТЕРФЕЙСА МОЗГ-КОМПЬЮТЕР МОТОРНО-ВООБРАЖАЕМОГО ТИПА

Интерфейс мозг-компьютер - это программно-аппаратная система, позволяющая оператору управлять внешними устройствами при помощи мысленных усилий. Одним из направлений разработки является использование нейрокомпьютерного интерфейса в восстановлении двигательной активности парализованных конечностей у пациентов, переживших инсульт. Очень важным аспектом такого рода интерфейса является обратная связь, ибо она замыкает контур и способствует тренировке в управлении, а впоследствии возможному образованию привычки в использовании интерфейса.

Целью исследования выступило сравнение точности классификации и степени десинхронизации мю-ритма при воображении движений руками в контуре интерфейса мозг-компьютер моторно-воображаемого типа с тремя командами

(воображаемое движение правой рукой, воображаемое движение левой рукой и «покой») при использовании тактильной, визуальной обратной связи и без обратной связи.

Регистрация ЭЭГ осуществлялась при помощи электроэнцефалографа NVX-52, сигнал записывался с 30 электродов в области моторной коры, программа NeoRec фиксировала сигнал ЭЭГ. Эксперимент состоял из трех экспериментальных сессий (проводимых в разные дни). Цель первой сессии – обучение испытуемого методике воображаемых движений. Вторая и третья сессии отводились на тестирование испытуемого при использовании различных вариантов обратной связи, при этом в одну сессию испытуемому предоставлялся только один вариант обратной связи и в качестве контроля проводились тесты без обратной связи. Длительность одной сессии не превышала 2 часа. Тестирование включало в себя обучение классификатора и 6 тестовых записей, 3 контрольных (без обратной связи) и 3 записи с предъявлением обратной связи. Во время записи испытуемому на экране монитора показывались в случайном порядке по 10 стимулов, соответствующих ментальным задачам: воображаемое движение левой рукой, воображаемое движение правой рукой и задача «покой», при которой испытуемый должен был максимально абстрагировать свое внимание от движений руками. Длительность стимула составляла 5 с, между стимулами была пауза длительностью 3 с. Предъявление обратной связи осуществлялось на протяжении всего времени выполнения задачи, по результатам классификатора каждые 700 мс. Визуальная обратная связь подавалась на монитор в виде удлиняющейся зеленой полоски. Тактильная обратная связь передавалась с помощью трех вибромоторов на предплечьях и тыльной стороне шеи, моторы вибрировали каждый раз, когда задача выполнялась в период классификации, при этом три мотора соответствовали трем ментальным задачам.

В исследовании приняли участие 7 здоровых праворуких испытуемых в возрасте 18-24 лет. Все испытуемые подписывали Информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен этической комиссией Института биологии и биомедицины ННГУ имени Н.И. Лобачевского.

В результате проведенной работы не было выявлено общей тенденции улучшения результатов с обратной связью, лишь в частных случаях одна из обратных связей позволяла испытуемым достигнуть лучших результатов. Степень десинхронизации статистически не менялась при различных вариантах обратной связи.

Научный руководитель – канд. физ.-мат. наук С. Ю. Гордлеева.

УДК 612.858.7

Е. В. Зайцева¹, Р. А. Макаров¹, А. Р. Насретдинов¹,
Г. Р. Валеева¹, Р. Н. Хазипов^{1,2}

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

²*Средиземноморский институт нейробиологии, г. Марсель,
Франция*

zaitceva.elena2505@gmail.com

НЕЙРОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛУХОВОЙ КОРЫ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС IN VIVO

На сегодняшний день в различных системах мозга выявлены принципиально новые паттерны активности, которые наблюдаются на ранних этапах развития и исчезают по мере формирования нейрональных сетей, сменяясь взрослыми паттернами. Известно, что в соматосенсорной и зрительной областях коры характерными паттернами активности являются ранние гамма-осцилляции и веретенообразные вспышки, которые запускаются спонтанной активностью на сенсорной периферии. Было показано, что эта ранняя осцилляторная активность обеспечивает синхронную активацию топографически связанных таламических и кортикальных нейронов и

участвует в формировании топографичных таламокортикальных карт. Накоплено значительное количество информации о том, как функционирует слуховая система новорожденных крыс в раннем постнатальном периоде развития, однако, эти данные ограничиваются подкорковыми структурами, и до сих пор вопрос о том, как функционирует слуховая кора новорожденных крыс, остается открытым.

В данном исследовании проводился анализ активности нейронов первичной слуховой коры (A1 область) новорожденных крыс *in vivo* период физиологической глухоты - с седьмого по двенадцатый день после рождения. С помощью многоканальных внеклеточных электродов регистрировали локальный полевой потенциал (ЛПП) и потенциалы действия (ПД) отдельных нейронов на глубине 1-6 слоев A1 области коры. Подтверждением расположения электрода в A1 коре служила регистрация кортикального ответа на электрическую стимуляцию нижних бугров четверохолмия.

Было установлено, что спонтанная активность в A1 области коры имеет прерывистый характер и организована в виде вспышек активности, длительностью 1.5-3с и частотой возникновения около 4 событий в минуту. Частотный спектр осцилляций ЛПП во время вспышек спонтанной активности выявил два характерных пика в диапазоне альфа и бета частот электроэнцефалографической активности. Осцилляции ЛПП во время спонтанной активности сопровождалось увеличением частоты ПД во всех регистрируемых слоях по глубине коры. Анализ кортикального ответа на электрическую стимуляцию нижних бугров четверохолмия показал, что максимальный уровень активации нейронов (детектируемый как повышение частоты ПД) приходится на 4 слой A1 коры, что соответствует анатомии сенсорных входов из слухового таламуса. Максимальная плотность входящего тока во время вспышек спонтанной активности, отражающая активацию синаптических входов, также приходилась на 4 кортикальный слой. Данное

наблюдение говорит о важности таламического входа для генерации спонтанной активности слуховой коры.

Таким образом, было показано, что сетевая нейрональная активность в развивающейся первичной слуховой коре мозга новорожденных крыс в период до появления слуха носит дискретный характер и организована в виде осцилляторных вспышек, чередующихся с периодами «молчания» кортикальных нейронов.

Работа выполнена при поддержке субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

Научный руководитель - Г. Р. Валеева, канд. биол. наук.

УДК 615.217.32

И.В. Зуева^{1,2}, К.А. Петров^{1,2,3}, В.Э. Семенов¹,
Р.М. Каюмова², А.Е. Тихонова²

¹ *Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
КазНЦ РАН*

² *Казанский федеральный университет*

³ *Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
zueva.irina.vladimirovna@gmail.com*

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ 6-МЕТИЛУРАЦИЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ПАМЯТИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой наиболее распространенную форму прогрессирующей деменции, особенностью которой является необратимое снижение когнитивных способностей. Болезнь характеризуется наличием двух типов невропатологических признаков: образованием внеклеточных β -амилоидных бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных переплетений. Согласно «холинергической» гипотезе БА, у пациентов отмечается атрофия

холинергических структур головного мозга, поэтому утвержденные методы лечения заключаются в применении ингибиторов холинэстераз. Однако все применяемые препараты оказывают только симптоматическое действие, никак не влияя на этиологию заболевания.

Известно, что ацетилхолинэстераза (АХЭ) способствует полимеризации патологического бета-амилоида, взаимодействуя с фрагментом белка предшественника амилоида в районе периферического анионного пункта (ПАП). Поэтому ингибиторы АХЭ, способные взаимодействовать с ПАП фермента способны снизить скорость агрегации бета-амилоида. Однако такие блокаторы либо токсичны *in vivo*, либо не способны преодолевать ГЭБ.

Ранее нами было показано, что алкиламмониевые производные 6-метилурацила связываются с АХЭ в области ПАП.

Целью работы являлась оценка эффективности блокаторов ПАП АХЭ на основе соединения № 76 (производного 6-метилурацила) для коррекции нарушений памяти при болезни Альцгеймера.

Болезнь моделировали внутрибрюшинной инъекцией скополамина (М-холинергического антагониста) мышам линии CD-1 (Питомник «Пущино») в дозе 2 мг/кг. Опытным группам вводили соединение № 76 в дозах 1,5,10 мг/кг (в/б) и традиционно применяемый в клинике донепезил в дозе 1 мг/кг (в/б) в качестве препарата сравнения.

Параметры пространственной памяти оценивались в Т-лабиринте в модели «вознаграждаемое чередование» в течение 14 дней. За критерий обученности было принято выполнение животным более 80% правильных заходов в рукав с приманкой в течение 3 дней подряд.

Введение скополамина вызвало значимое снижение количества правильных чередований в Т-лабиринте, а так же вдвое снизило процент животных, достигших критерия обученности к концу эксперимента по сравнению с контрольной группой, получавшей только воду для инъекций. Введение соединения № 76 в дозах 1 и 5 мг/кг, как и введение донепезила в дозе 1 мг/кг достоверно снизило

вызванный скополамином дефицит памяти. Под воздействием соединения № 76 в дозах 1 и 5 мг/кг критерия обученности в Т-лабиринте достигли 67% и 77% мышей соответственно. Полученные результаты соответствуют проценту обученных мышей, получавших донепезил. При этом в группе животных получавших соединение № 76 в дозе 10 мг/кг не было выявлено значимого влияния на параметры памяти в Т-лабиринте. Таким образом, соединение №76 оказывает положительное влияние на параметры пространственной памяти в Т-лабиринте в условиях фармакологической модели БА.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-50-00014.

Научный руководитель – К.А. Петров, канд. биол. наук, доцент

УДК 612.8

Я. Г. Коньшев, К. С. Королёва, Н. Н. Хаертдинов;

Казанский федеральный университет

mrdemyank@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ВОЗБУДИМОСТЬ ТРИГЕМИНАЛЬНОГО НЕРВА КРЫСЫ

Введение. Гомоцистеин – это непротеиногенная аминокислота, является промежуточным звеном в биосинтезе метионина. Гипергомоцистеинемия – это заболевания связанное с аномально высоким уровнем гомоцистеина в крови. Высокие концентрации гомоцистеина в плазме негативно сказываются на работу сердечно-сосудистой, нервной систем, приводят к оксидативному стрессу и гибели клеток. Кроме того, у беременных женщин с гипергомоцистеинемией, наблюдаются аномалии развития плода, что в дальнейшем приводит к отставанию в умственном и физическом развитии ребенка. Также гипергомоцистеинемия имеет непосредственную связь с мигренью, стимулируя начало приступов мигрени через изменение болевого порога. Таким образом, целью данной работы является исследование возбудимости

тригеминального нерва крысы в условиях моделирования пренатальной гипергомоцистеинемии.

Метод и результаты. Было взято две группы крыс, у которых перед началом острого эксперимента определяли уровень гомоцистеина в крови. Первую, контрольную группу кормили обычным кормом. Вторую группа питалась пищей богатую метионином. Метиониновая диета поддерживалась на протяжении всей беременности крыс и последующие две недели после рождения потомства. Новорожденные крысята получали высокую дозировку метионина только с молоком матери. Использовались крысы возрастной группы 40-42 дня. После декапитации черепная коробка тщательно очищалась от поверхностных мышечных тканей. Череп разделялась на две половины, после чего мозг аккуратно удалялся, оставляя нетронутой твердую мозговую оболочку, с сохранившимися отростками тройничного нерва. Полученные половины черепа перфузировались в физиологическом растворе Krebsa. Перед экспериментом периферический отросток тригеминального нерва вырезался из твердой оболочки мозга и всасывался в стеклянный электрод. Аппликация веществ производилась в область расхождение сосудов, а сигналы записывались с использованием усилителя, а в последствии визуализировались и анализировались. Исходя из полученных данных, определяли частоту ноцицептивных сигналов. Анализ частоты спайкования тригеминального нерва показал повышение базальной активности у животных с пренатальной гипергомоцистеинемии по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе базовая частота потенциалов действия составила $0,94 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$; в группе животных с гипергомоцистеинемией - $2,6 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ ($n=6$, $p < 0.05$). в условиях аппликации KCl в концентрациях 5 мМ, 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ было выявлено, что пороговая концентрация KCl, вызывающая увеличение частоты спайкования, была ниже для группы животных с пренатальной гипергомоцистеинемией (5 мМ), по сравнению с животными контрольной группы (25 мМ).

Выводы. Таким образом, в условиях моделирования пренатальной гипергомоцистеинемии наблюдается повышение спонтанной базовой активности тригеминального нерва. Кроме того, повышение частоты спайкования нерва у экспериментальной группы происходит при меньших концентрациях KCl, что указывает на более высокую возбудимость нервных окончаний менингеальных нервов, относящихся к возникновению боли при мигрени.

Научный руководитель Ситдикова Г.Ф, д-р биол. наук, профессор.

УДК 612.832

Е. Ю. Лобан¹, А.Э. Балтина², К. Д. Жукова¹

¹*Казанский федеральный университет*

²*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина*

Kety-smile@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЗВАННЫХ МОТОРНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ МЫШЦ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫСЫ ПРИ ЭПИДУРАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СПИНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

В настоящее время исследуется много различных методов для снижения негативных факторов влияния травмы спинного мозга (ТСМ). Одним из таких методов является применение локальной гипотермии в первые часы после травмы. Роль гипотермии как нейрозащитного средства связана с замедлением клеточного обмена в результате снижения температуры тела. Известно, что применение локальной гипотермии способствует сохранению клеточных элементов спинного мозга, а также замедляет развитие воспаления и апоптоза. Целью работы являлась оценка эффективности применения локальной гипотермии после экспериментальной контузионной травмы спинного мозга.

Исследование проводилось на 30 лабораторных крысах Wistar, весом 150-200г. Травму наносили на уровне Th8. Хладагент в виде

замороженного 0,9% раствора NaCl для инфузий, помещали в декомпрессионном окне ламинэктомированного позвонка на твердую мозговую оболочку в области заинтересованного сегмента спинного мозга в течение 20 минут. Были обследованы две экспериментальные группы: животные с контузией спинного мозга и животные, получавшие гипотермические процедуры после контузии спинного мозга. Моторные вызванные потенциалы, вызванные стимуляцией эпидурального спинного мозга, были использованы для оценки функционального состояния спинного мозга после ТСМ. В этом исследовании ранний ответ (ER) и средний ответ (MR) мышц задней конечности у крыс (*m. gastrocnemius* (ИМ), *m. soleus* (КМ) и *m. tibialis* (ББМ)), вызванных эпидуральной стимуляцией S1 сегмента спинного мозга изучали в течение одного месяца после применения локальной гипотермии после контузии спинного мозга. Контролем служил группа интактных животных. Все процедуры выполнялись в соответствии с нормами биоэтики, и данные обрабатывались статистически с использованием ANOVA.

Результаты. Мы обнаружили, что максимальная амплитуда и порог ER и MR ИМ не изменялись существенно в течение одного месяца после ТСМ, но после применения локальной гипотермии порог MR не увеличивался значительно до 14 дней и возвращался к контрольным значениям на 30 сутки.

Максимальная амплитуда ER и MR КМ оставалась сниженной 30 суток в группе с ТСМ и увеличивалась до $191 \pm 57\%$ к 30 суткам в группе с гипотермией. Значение порога ответов ER и MR существенно не изменялось.

Максимальная амплитуда ER ББМ была увеличена до $221 \pm 53\%$ на 1 день после ТСМ и вернулась к контрольным значениям на 21 день. Напротив, в группе с гипотермией максимальная амплитуда ER значительно уменьшилась на 1 сутки (до $26 \pm 16\%$), а затем восстановилась до контрольных значений на 21 день и значительно снизилась к 30 суткам (до $29 \pm 9\%$). Амплитуда MR ББМ не изменилась существенно в первой группе. Но во второй группе наблюдалось значительное уменьшение амплитуды MR на 7 день после ТСМ и

гипотермии (до $29 \pm 10\%$). Порог ER и MR ББМ были увеличился до $2,77 \pm 1,23$ В на 14 день и до $2 \pm 0,3$ В на 21 день только после лечения гипотермией.

Ранее было показано, что местная гипотермия после ушиба спинного мозга может замедлить развитие возбудимости мотонейронов у собак в течение недели. Наши результаты также подтвердили, что лечение гипотермией может снижать возбудимость спинальных двигательных центров мышц задней конечности крысы в течение первых 3 недель после ТСМ. Наши данные показали, что гипотермия наряду с тормозящим действием на процессы повреждения, возникающие после ТСМ, может вызвать задержку восстановления функций нервно-мышечной системы задних конечностей у крыс. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №17-04-01746А.

Научный руководитель – Т.В. Балтина, доцент, канд. биол. наук

УДК 577.25

Т.М. Мирзоев, С.А. Тыганов

Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва

tmirzoev@yandex.ru

**АНАБОЛИЧЕСКИЙ ОТВЕТ *M.SOLEUS* КРЫСЫ
НА МЕХАНИЧЕСКИЙ СИГНАЛ *EX VIVO* ПОСЛЕ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ. РОЛЬ СТРЕТЧ-
АКТИВИРУЕМЫХ КАНАЛОВ**

Механические стимулы играют ключевую роль в регуляции синтеза белка и массы скелетной мышцы млекопитающих. Исследования последних лет показали важность изучения механотрансдукции, т.е. преобразования внешнего механического сигнала в биохимический ответ в виде внутриклеточных сигнальных каскадов. Ключевым анаболическим сигнальным путём, активирующимся в ответ на механические стимулы, является сигнальный каскад mTORC1/p70S6k. Однако молекулярные механизмы

анаболической реализации внешнего механического сигнала в мышечном волокне на фоне функциональной разгрузки изучены недостаточно. При этом важнейшую роль в восприятии мышечным волокном внешнего механического сигнала могут играть стретч-активируемые ионные каналы (stretch-activated channels, SAC).

Цель исследования состояла в оценке интенсивности белкового синтеза и ключевых мишеней mTORC1 в ответ на серию эксцентрических сокращений (ЭС) камбаловидной мышцы (*m.soleus*) крысы на фоне различных сроков функциональной разгрузки. Кроме того, в задачи исследования входило выявление роли SAC в проведении механического сигнала к анаболическому пути mTORC1/p70S6k в *m.soleus* крысы после 7-суточной функциональной разгрузки.

Функциональная разгрузка мышц задних конечностей осуществлялась методом антиортостатического вывешивания (hindlimb suspension, HS). Крысы Wistar были разделены на 4 группы: «Контроль», «1-HS» (вывешивание в течение 1 суток), «3-HS» (3-суточное вывешивание) и «7-HS» (7-суточное вывешивание). После окончания вывешивания изолированные камбаловидные мышцы крыс были подвергнуты серии эксцентрических сокращений *ex vivo*. Скорость синтеза белка оценивали методом SUnSET (оценка по включению пурамицина в полипептидную цепь). Затем методом вестерн-блоттинга было определено содержание фосфорилированных форм маркера mTORC1 – рибосомальной киназы p70S6k. Было обнаружено, что степень фосфорилирования p70S6k и прирост синтеза белка в *m.soleus* крысы были значительно меньше после 3- и 7-суточной функциональной разгрузки по сравнению с контрольными значениями. Динамика прироста уровня фосфорилирования p70-S6k после ЭС по мере увеличения длительности разгрузки была похожа на аналогичную динамику прироста синтеза белка.

Для выявления роли стретч-активируемых каналов в передаче механического сигнала использовался ингибитор SAC GdCl₃ (20 μM),

который добавлялся в среду с изолированной *m.soleus* после периода 7-суточной разгрузки. Было обнаружено одинаковое снижение фосфорилирования p70S6k, рибосомального белка S6 и 4E-BP1 относительно контроля как в группе «чистого» вывешивания, так и в группе с блокатором SAC.

Таким образом, серия ЭС изолированной *m.soleus* крысы на фоне функциональной разгрузки вызывает более слабую активацию белкового синтеза, что может быть обусловлено снижением механо-зависимого ответа сигнального пути mTORC1-p70S6k. Сниженный анаболический ответ мог быть связан с инактивацией SAC. Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-60055 мол_а_дк.

Научный руководитель – Б.С. Шенкман, д-р биол. наук, проф.

УДК 612.886

Е.А. Бирюкова, И.С. Миронюк, М.Ю. Раваева, Е.Н. Чуян

Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского

г. Симферополь

biotema@mail.ru

РОЛЬ ТРЕНИНГОВ ПО ОПОРНОЙ РЕАКЦИИ В ИЗМЕНЕНИИ ВЕСТИБУЛО-ВЕГЕТАТИВНЫХ И СЕНСОМОТОРНЫХ РЕАКЦИЙ СПОРТСМЕНОВ-ОРИЕНТИРОВЩИКОВ

Методами вариабельности сердечного ритма, стабилотрии (проба Ромберга), видеонистагмографии (оценка послевращательного нистагма), а также аппаратного психофизиологического тестирования (тесты: «Простая зрительно-моторная реакция», «Оценка внимания», «таблицы Шульте-Платонова») у 12-ти спортсменов-ориентировщиков высшей квалификации и 12 волонтеров, не занимающихся спортом изучены вестибуло-вегетативные и сенсомоторные реакции организма на десятидневный курс тренировок по опорной реакции по стабилотрическому сигналу.

Полученные нами данные показали, что спортсмены высшей квалификации обладают более высокими адаптационными возможностями и более выгодным типом сенсомоторной реакции, по сравнению с волонтерами,

не занимающимися спортом. Это обуславливает высокие значения двигательного-координационного потенциала и концентрации внимания, а также большую эффективность постурального контроля, по сравнению с волонтерами, не занимающимися спортом. Кроме того, испытуемые, занимающиеся спортивным ориентированием быстрее адаптировались к предлагаемым заданиям, а скорость и качество выполнения заданий у них была выше, чем у испытуемых, не занимающихся спортом.

Полученные нами данные о снижении индекса напряженности, увеличения спектральных компонентов сердечного ритма, снижении времени вестибулярного послеवращательного нистагма у испытуемых волонтеров под воздействием 5 -тиминутного БОС-тренинга по опорной реакции на протяжении 10-ти суток можно однозначно считать положительным эффектом тренировки вестибулярного аппарата в ответ на вращательную нагрузку под влиянием данного фактора.

Выполнено в рамках гранта Государственного Совета Республики Крым молодым ученым Республики Крым от 01 февраля 2017 № п 368-1/17

УДК 612.171.1

Митаева Я.И., Можеров А.М., Мухина И.В.

Нижегородский государственный университет

им. Н. И. Лобачевского

yasya13@mail.ru

CA²⁺ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ ПОЛЯ САЗ ГИППОКАМПА В НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Согласно современным представлениям минимальной функциональной единицей нервной системы является нейронная сеть, формирование которой происходит в неонатальный период постнатального онтогенеза. Именно на уровне нейронной сети происходят процессы консолидации памяти, обработки и передачи информации. Кроме нейронных сетей в мозге существуют и астроцитарные сети. Астроциты – электрически невозбудимые клетки, поэтому изучение их активности не возможно

биоэлектрическими методами. Показано, что одним из показателей активности как нейронов, так и астроцитов являются Ca^{2+} осцилляции. В данной работе было проведено исследование динамики спонтанных Ca^{2+} осцилляций клеток срезов гиппокампа крыс раннего (P5-8, P14-16) и позднего (P21-25) неонатальных периодов постнатального онтогенеза. Использование переживающих срезов мозга и функционального флуоресцентного имиджинга позволило регистрировать долговременные изменения внутриклеточного Ca^{2+} одновременно у нескольких клеток, в результате чего стало возможным оценить сетевую Ca^{2+} активность клеток СА3 поля гиппокампа.

В результате проведенных исследований было показано, что параметры Ca^{2+} осцилляций клеток СА3 поля срезов гиппокампа изменяются в зависимости от неонатального периода постнатального онтогенеза крыс. Уменьшение количества Ca^{2+} осцилляций с возрастом обусловлено формированием и усложнением синаптически связанных нейронных сетей, переходом электрических синапсов в химические. Переходным периодом является 14-16 день постнатального онтогенеза, а на 21 день - наблюдается полностью сформированная нейронная сеть. Электрически связанная сеть является малоконтролируемой, возбуждение свободно распространяется по сети, вовлекая в работу все клетки, что проявляется в высокой Ca^{2+} активности у клеток гиппокампа крыс младшей возрастной группы. В срезе гиппокампа мозга позднего неонатального периода постнатального онтогенеза спонтанная Ca^{2+} активность низкая с связи с отсутствием активной нейронной сети. В этом случае спонтанные Ca^{2+} осцилляции, были обусловлены в основном, метаболической активностью клеток. Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что изменения Ca^{2+} активности клеток поля СА3 гиппокампа крыс, происходящие в процессе неонатального периода постнатального онтогенеза, напрямую связаны с функционированием нейронных сетей и

метаболическим состоянием клеток. Работа поддержана стипендией Президента РФ (СП-1531.2015.4).

УДК 612.816.7

А. С. Митева

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

anka.miteva@gmail.com

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ РЕЦЕПТОРОВ P₂-ТИПА НА СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ ТРЕБУЕТ НАЛИЧИЯ ПАННЕКСИНА-1

Паннексин 1 – мембранный белковый комплекс, характерный для многих систем органов, в том числе для ЦНС и некоторых участков ПНС. При активации различными метаболическими и механическими сигналами, паннексины способны формировать пору, пропускающую крупные молекулы, основная из которых – АТФ.

АТФ, присутствующий в синаптической щели, является важной сигнальной молекулой, влияющей на работу моторной терминали и мышечного волокна. При этом его воздействие может быть разнонаправленным в зависимости от источников поступления в щель и порога активации различных типов P₂ рецепторов. Источниками пуринов может служить везикулярная секреция АТФ совместно с ацетилхолином при работе моторного синапса, и, возможно, выход через паннексины. Однако вклад этих источников в создание рабочей концентрации пуринов в синаптической щели не определен. Таким образом целью данной работы являлось определение влияния паннексинов на активность различных типов P₂ рецепторов, через создание эффективной концентрации АТФ в синаптической щели.

Для решения этого вопроса использовали нервно-мышечные препараты диафрагмы мышей дикого типа и мышей, нокаутных по гену паннексина 1 (Panx^{-/-}). Электрофизиологическими методами регистрировали параметры миниатюрных потенциалов концевой

пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) в ритмических залпах (50 Гц, 1 сек).

Выявление действия эндогенного АТФ проводили при помощи блокатора распада АТФ в синаптической щели (ARL 67156, 50 мкМ). Оказалось, что основное действие такой блокады – постсинаптическое, что проявляется в виде увеличения временных показателей МПКП и ПКП у мышей дикого типа, и, по-видимому, обусловлено активацией P_2Y_1 рецепторов. У мышей $Panx^{-/-}$ блокада распада АТФ не оказывает влияния на параметры спонтанной и вызванной активности, демонстрируя недостаток синаптической АТФ в условиях отсутствия паннексинов.

Суммарное направление влияния пресинаптических P_2 рецепторов выясняли при помощи их неселективного антагониста PPADS (10 мкМ). На его фоне происходило увеличение квантового состава ПКП у мышей дикого типа, демонстрируя общее тормозное действие P_2 рецепторов на секрецию медиатора. У мышей $Panx^{-/-}$ такого эффекта не наблюдалось. Для детального изучения пресинаптических P_2 рецепторов использовали селективные агонисты и антагонисты P_2Y_{13} и P_2X_7 рецепторов, присутствие которых показано для этого типа синапсов.

Агонист P_2Y_{13} рецепторов IDP (100 мкМ) у мышей дикого типа вызывал уменьшение квантового состава ПКП, а у мышей $Panx^{-/-}$ снижение амплитуды МПКП, что показывает присутствие и активность этих рецепторов у двух исследуемых линий мышей. Антагонист P_2Y_{13} рецепторов MRS 2211 (10 мкМ) вызывал значимый прирост квантового состава ПКП только у мышей дикого типа, а у животных $Panx^{-/-}$ этот параметр оставался неизменным по сравнению с контролем. В совокупности, полученные результаты свидетельствуют о функциональной неактивности P_2Y_{13} рецепторов у мышей, нокаутных по гену паннексина 1. Это может объясняться недостаточной концентрацией АТФ в синаптической щели.

Воздействие агониста и антагониста P_2X_7 рецепторов – VzАТР (30 мкМ) и А740003 (1 мкМ), соответственно, не оказало влияния на параметры нервно-мышечной передачи у мышей дикого типа. У мышей $Panx^{-/-}$ при действии VzАТР увеличивался квантовый состав ПКП. Видимо, активность P_2X_7 рецепторов в моторных синапсах мышей дикого типа не проявляется в связи с преобладающим тормозным влиянием со стороны P_2Y_{13} рецепторов, которое исчезает при недостаточности АТФ в синаптической щели в отсутствии паннексинов.

Таким образом, при отсутствии паннексинов АТФ, выделяющегося из синаптических везикул, оказывается недостаточно для осуществления разнообразных регуляторных влияний со стороны пре- и постсинаптических рецепторов P_2 -типа.

Научный руководитель – А. Е. Гайдуков, канд. биол. наук

УДК 612.886.3

Э.Р. Мухаметова^{1,2}, Г.Г. Яфарова¹, Т.В. Балтина¹

¹*Казанский федеральный университет,*

OpenLab Двигательная нейрореабилитация

²*Медико-санитарная часть «Казанский (Приволжский)*

федеральный университет»

lviraqpg@gmail.com

ЭФФЕКТЫ ВИБРАЦИОННОГО РАЗДРАЖЕНИЯ МИОГЕННЫХ ТРИГГЕРНЫХ ТОЧЕК ЦЕРВИКАЛЬНОЙ МУСКУЛАТУРЫ НА ПОСТУРАЛЬНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ

В настоящее время уделяется большое внимание цервикальным нарушениям в качестве патофизиологического компонента постуральной неустойчивости. Шейный отдел позвоночника обеспечивает проприоцептивный вход с помощью большого количества шейных механорецепторов и различных связей, как с периферическим, так и центральными компонентами вестибулярной системы. Это исследование направлено на изучение того как вибрационное

раздражение миогенных триггерных точек может повлиять на постуральную стабильность. В исследовании приняло участие 38 условно-здоровых испытуемых (в возрасте 20-25 лет), из них 29 человек с выявленными латентными триггерами трапецевидной мышцы, 9 человек - контрольная группа (без триггеров). Обе группы оценивались однократно в равных условиях. Вибрационное воздействие проводилось с частотой 100 Гц в течение 1 мин. С целью оценки постуральной стабильности мы использовали стандартный стабилографический тест до и после вибрационного воздействия через 30, 60, 180 секунд. Результат, полученный до вибрационного воздействия, принимался за 100% (фоновая проба); все результаты оценивались в зависимости от фоновой пробы. Наиболее значимое отличие между контрольной группой и испытуемыми с триггерными зонами выявлено через 30 секунд после вибрационного раздражения. Так, статистический анализ показателя качества функции равновесия возрос на $3,65\% \pm 1,16$ ($p < 0,05$) в испытуемой группе и показал недостоверное снижение в группе контроля. Обе группы имели тенденцию к повышению через 60 и 180 сек. после вибрационного раздражения. Однако только испытуемые с триггерными зонами трапецевидной мускулатуры показывали достоверный рост этого показателя на $6,96\% \pm 2,05$ и $8,69\% \pm 2,28$ ($p < 0,05$) соответственно. Линейная скорость смещения достоверно снижается через 30 сек после вибрации в испытуемой группе, в то время как в контрольной группе этот показатель незначительно снижается от фоновой пробы. Интересно, что испытуемые с триггерными точками показали значительное снижение линейной скорости смещения во фронтальной плоскости по сравнению с сагиттальной плоскостью на $8,2\% \pm 4,0$ и $4,8\% \pm 2,6$ соответственно. Нами показано, что стабилографические показатели достоверно улучшаются после вибрационного воздействия на миогенные триггерные точки трапецевидных мышц. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения

государственного задания в сфере научной деятельности. Задание №17.9783.2017/8.9.

Научный руководитель – Т.В. Балтина, канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии человека и животных КФУ

УДК 612.825.58

И. Н. Носикова,¹ Е. С. Томиловская,¹ И. В. Рукавишников,¹
А. Д. Румшильская,² Л. Д. Литвинова,² Е. В. Печенкова,²
Е. А. Мершина,² В. Е. Синицын,² А. Ван Омберген,³ Ф. Уайтс,³
И. Б. Козловская¹

¹*ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия*

²*ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава
России, Москва, Россия*

³*Университет г. Антверпен, Бельгия
nosikovainna@mail.ru*

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ МОТОРНЫХ ЗОН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЛОКОМОТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ОПОРНЫХ ЗОН СТОП У КОСМОНАВТОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что длительное пребывание в условиях измененной гравитации сопровождается существенными нарушениями в системах двигательного управления (Kozlovskaya I.V., 1987). Механизмы этих нарушений до настоящего времени изучены недостаточно. Имеются основания предполагать, что в их развитии важная роль принадлежит изменениям функциональной организации коры головного мозга (КГМ). В совместных исследованиях специалистов ГНЦ РФ - ИМБП РАН и НЦ неврологии РАМН, были описаны зоны активации КГМ при осуществлении механической стимуляции опорных зон стоп в режимах локомоций. (Кремнева Е.А., 2013). Целью данного исследования явилось

изучение характеристик зон КГМ, вовлеченных в регуляцию локомоций, до и после длительных космических полетов (КП).

Исследование выполнено с участием 6 членов экипажей международной космической станции, длительность полетов которых составляла 6 месяцев, и би здоровых добровольцев. У испытуемых обеих групп проводились фМРТ исследования паттерна активации зон коры головного мозга на фоне локомоторной стимуляции опорных зон стоп. Эксперименты выполнялись по специально разработанному протоколу, согласно которому 20 с механической стимуляции чередовались с 20 с покоя; протокол включал 8 таких временных интервалов (Черникова Л.А., 2011). Стимуляция опорных зон стоп осуществлялась в режиме локомоций со скоростью 75 шагов/мин и давлением на опорные зоны стоп 40 кПа. В группе космонавтов фМРТ исследования проводились до начала, на 8-9 сутки после завершения шестимесячного КП, а также после 6 месяцев восстановительного периода.

В группе контроля фМРТ исследования проводились также со средним интервалом в 6 месяцев, в ходе которых испытуемые поддерживали обычный и неизменный порядок жизни. В данной группе ни у одного из испытуемых паттерны активации зон коры головного мозга после 6 месяцев контрольного периода не обнаружили достоверных отличий от исходных. В группе космонавтов изменения величин зон активации сенсомоторной коры после 6-месячного пребывания в невесомости имели разнонаправленный характер. У 2 из 6 членов группы после полета в ответ на стимуляцию опорных зон стоп наблюдалось снижение активации в SM1 + SMA и IPL (объем активации в этих зонах составил $4064 \pm 1737 \text{ мм}^3$ и $729 \pm 916 \text{ мм}^3$ до и после полета, соответственно). У двух космонавтов объем активации после полета в сравнении с исходными данными возрастал, составив в указанных зонах $3929 \pm 1699 \text{ мм}^3$ и $10138 \pm 1546 \text{ мм}^3$ до и после полета, соответственно.

Через 6 месяцев после завершения полетов картина активации локомоторных зон коры головного мозга в группе космонавтов преимущественно соответствовала исходной, что подтверждало

функциональность и обратимость обнаруженных после полета изменений.

Исследование поддержано Российской академией наук и Европейским космическим агентством.

Научный руководитель – Е.С. Томиловская, к.б.н.

УДК 616-03

Д. Э. Сабирова, Э.И. Ямалитдинова, М.Э.Балтин

Казанский федеральный университет

Казань, Россия,

sabirova.dianka@list.ru

ЛОКАЛЬНАЯ ДОСТАВКИ ПОЛИМЕРНЫХ КОНЬЮГАТОВ: ТЕСТИРОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К ЛЕЧЕНИЮ ОСТРОЙ ТРАВМЫ

Острая травма спинного мозга (ТСМ) является сложной биомедицинской проблемой. Актуальность проблемы обусловлена инвалидизацией и высокой смертностью пострадавших. Эффективных методов лечения ТСМ на сегодняшний день не существует. Это связано с тем, что любой живой организм обладает защитными механизмами, нацеленными на выделение или биологическое разрушение всех чужеродных соединений и веществ, поступающих извне. Также затруднено проникновение непосредственно через биологические барьеры, а также через образующийся глиальный рубец. Поэтому, на данный момент развития науки, наблюдается значительный интерес к использованию полимерных систем в качестве систем доставки лекарственных средств в спинной мозг при травме. Целью работы являлась оценка эффективности действия полимерных конъюгатов в острой фазе развития травматической болезни спинного мозга после нанесения контузионной травмы у крыс. Работа выполнена в период с сентября 2016 по май 2017 года в НИЛ OpenLab «Двигательная

нейрореабилитация» при кафедре физиологии человека и животных КФУ.

В ходе экспериментов было обследовано 17 нелинейных лабораторных крыс обоих полов, весом 200 ± 20 г, возрастом до 1 года. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм. Открытая позвоночно-спинномозговая травма наносилась на уровне позвонка T8 по модифицированной методике А. R. Allen (1911). После произведения ламинэктомии декомпрессионное окно очищалось от излишков крови и жидкости. Затем на место декомпрессионного окна наносили каплю исследуемого геля через шприц 1 мкл до полного перекрытия окна исследуемый гелем. Затем производилась оценка электрофизиологических параметров электрических ответов при эпидуральной стимуляции спинного мозга на уровне L1.

В ходе исследований мы выявили, что в ранней фазе травматической болезни спинного мозга при эпидуральной стимуляции происходит увеличение латентного периода моторных ответов камбаловидной мышцы крысы. Максимальная амплитуда коротколатентного ответа уменьшается, а средне- и длиннолатентного ответов не изменяется. Инфузия метилпреднизалона по стандартному терапевтическому протоколу после травмы спинного мозга не оказывала влияния на состояние спинальных центров икроножной мышцы, и оказывала тормозное влияние на центры камбаловидной мышцы у крысы. Аппликация полимера на поверхность спинного мозга после его контузии не вызывала изменения моторных ответов мышц голени, что говорит об отсутствии влияния самого полимера на функциональное состояние нейронов после травмы спинного мозга. Аппликация комплекса полимера с метилпреднизалоном после контузии спинного мозга оказывала возбуждающее воздействие на центры мышц голени крысы, что может свидетельствовать об облегчении доставки

метилпреднизалона к нейронам спинного мозга и снятии его отрицательного эффекта при инфузионном введении.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 17-04-01746-а.

Научный руководитель – Т.В. Балтина, канд. биол. наук, доцент.

УДК 796.011.5:796.09

Я. Я. Тыньо¹, В. Ю. Енюшин², М. В. Носова¹

1 — Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина

2— Центр спорта и образования «Олимп» Москомспорта

yytynio@mail.ru

ДОПИНГ, ЗАПРЕЩЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ИХ НАТУРАЛЬНЫЕ ЗАМЕНИТЕЛИ

В настоящее время проблема злоупотребления допингами настолько серьезна, что борьба медицинской комиссии международного олимпийского комитета против допингов может доходить до мировых скандалов. К примеру, в прошлом году на Олимпиаде в Рио-де-Жанейро многие русские спортсмены были уличены в употреблении мельдония, запрещенного Всемирным антидопинговым агентством.

Цель работы — провести сравнение наиболее популярных допингов, запрещенных препаратов и найти рациональный заменитель допинга среди натуральных препаратов.

С точки зрения достигаемого эффекта спортивные допинги можно условно разделить на 2 основные группы:

1. препараты, применяемые для кратковременной стимуляции работоспособности, психического и физического тонуса спортсмена (психостимулирующие средства, аналептики, препараты, возбуждающе действующие преимущественно на спинной мозг);

2. препараты, применяемые в течение длительного времени в ходе тренировочного процесса для наращивания мышечной массы и обеспечения адаптации спортсмена к максимальным физическим нагрузкам: улучшающие координацию движений, способствующие снижению веса, стероиды и другие анаболизующие средства.

Фармакологические недопинговые препараты и биологически активные добавки делятся на адаптогены, антигипоксантами, ноотропные препараты, антиоксиданты, препараты пластического действия, средства энергетического действия, иммуномодуляторы, энтеросорбенты, стимуляторы кроветворения.

Употребление таких средств помогает наладить работу пищеварительной системы, обменные процессы организма, укрепить иммунитет. К тому же, их действие направлено на восстановление организма без последующего разрушительного воздействия. Однако на данный момент недостаточно описаны противопоказания к применению, кроме того, в состав данных препаратов могут входить компоненты, несовместимые между собой.

Было проведено сравнение наиболее популярных допингов, запрещенных препаратов. В качестве рационального заменителя допинга эритропоэтина, стимулирующего образование эритроцитов из поздних клеток-предшественников и повышающего выход ретикулоцитов из костного мозга в зависимости от потребления кислорода целесообразно применять Церулоплазмин, Ритмокор, а также препараты, содержащие железо. Вместо анаболиков можно рекомендовать оротат калия Сорбит, Фруктоза, Экдистен и препараты, содержащие экстракт левзеи сафлоровидной, а также продукты пчеловодства. В качестве заменителя стимуляторов психической деятельности целесообразно использовать различные адаптогены природного происхождения (женьшень обыкновенный, родиола розовая).

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 616.131 – 091

Н. В. Панькова., М. М. Артемьева М.М., А. С. Попова,
Н. А. Медведева.

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова
nadezhda.pankova.nnov@gmail.com

ХРОНИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ЭСТРАДИОЛА И ПРЕРЫВИСТОЙ ГИПОКСИИ НА ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У САМЦОВ И САМОК КРЫС ПОПУЛЯЦИИ ВИСТАР

С женским половым гормоном эстрадиолом (Е2) связывают устойчивость женщин репродуктивного возраста к заболеваниям сердца. Однако легочной гипертензией (ЛГ) женщины страдают чаще мужчин, хотя выживаемость у них выше. Одним из механизмов адаптации организма к гипоксии является усиление кислородтранспортной функции крови, что выражается в увеличении гематокрита. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния хронически вводимого эстрадиола и хронической прерывистой гипоксии на концентрацию эритроцитов (RBC) и гемоглобина (HGB) в крови, гематокрит (HCT), средний объем эритроцита (MCV) у самцов и самок крыс.

В эксперименте участвовало по 4 группы самцов и самок крыс популяции Wistar, по 5-8 животных в каждой группе. В двухмесячном возрасте животные подвергались билатеральной гонадэктомии. Спустя две недели половина крыс начинала ежедневно подкожно получать Е2 в дозе 15 мкг/кг. Другая часть животных получала растворитель Е2 пропиленгликоль (ПГ). Через 2 недели половина крыс помещалась в условия хронической гипобарической прерывистой гипоксии (ХГПГ) на 10 часов в день в течении 14 дней с постоянным содержанием кислорода в гипобарической камере равной 10%. Остальные животные содержались в виварных условиях (контрольная группа). Введение соответствующих веществ не прекращалось. На 14е сутки после начала гипоксии у животных из хвоста бралась кровь на исследование. На следующий день у животных измерялось систолическое давление в правом желудочке сердца (СПЖД) для оценки степени развития легочной гипертензии.

Увеличение СПЖД произошло у всех групп животных, подвергавшихся ХГПГ по сравнению с контрольными животными, что говорит о развитии ЛГ. В норме величина СПЖД не имела половых различий, однако у гипоксических самок с ПГ показатель был достоверно ($p < 0,05$) выше чем у самцов и составлял $73,9 \pm 6,0$ мм рт. ст. и $56,1 \pm 1,5$ мм рт. ст. соответственно. Хроническое введение E2 самцам нивелировало это различие. Для самок изменение СПЖД в ответ на введение E2 показано не было. Таким образом, эстрадиол не оказывал влияние на степень ЛГ у самок крыс, а у самцов усугублял патологию.

Гипоксия приводила к достоверному ($p < 0,05$) увеличению НСТ и HGB в крови у всех групп животных. У контрольных животных ни введение E2 ни гендерные различия ни оказывали влияния на эти показатели. У гипоксических самок крыс введение E2 достоверно ($p < 0,05$) снижало HGB с $200 \pm 2,5$ г/л до $180 \pm 3,9$ г/л. У самцов данной реакции показано не было.

У контрольных самцов крыс концентрация эритроцитов была на 33% выше, чем у самок крыс ($p < 0,05$), при этом введение E2 не сказывалось на RBC. Гипоксия увеличивала RBC только у самок крыс на 65% у ПГ группы и на 45% для E2 группы ($p < 0,05$). Таким образом ни гипоксия ни введение E2 не влияли на RBC у самцов крыс.

У контрольных самцов крыс MCV был достоверно ниже по сравнению с самками на 20% у ПГ групп и на 15% для E2 групп. Хроническое введение E2 не оказывало влияние на MCV. Гипоксия увеличивала MCV только у самцов крыс с $51,8 \pm 1,16$ фл до $62,8 \pm 1,39$ фл для ПГ групп и с $54,6 \pm 1,56$ фл до $62,8 \pm 0,74$ фл для E2 групп. Таким образом, ни гипоксия ни хроническое введение эстрадиола не влияли на средний объем эритроцита у самок крыс.

Выводы. Существуют гендерные различия в механизмах адаптивного увеличения гематокрита при развитии гипоксической формы легочной гипертензии. У самок оно достигается за счет увеличения числа эритроцитов, а у самцов путем увеличения объема эритроцита. По-видимому, эстрадиол не влияет на способ поддержания кислородной ёмкости крови.

Научный руководитель – Н. А. Медведева, проф., д-р биол. наук.

УДК 612.3:613.3:796.01

Я. Я. Тыньо¹, А. С. Голованов², А. А. Пронина¹

1 — Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина

*2 — Центр спорта и образования «Олимп» Москомспорта
yytynio@mail.ru*

СПОРТИВНОЕ ПИТАНИЕ. ВОДНО-СОЛЕВОЙ БАЛАНС. ПОДДЕРЖИВАЮЩИЕ И ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ ТРЕНИРОВКИ

Спортивное питание является важным составляющим при тренировках спортсмена, а также при его подготовке к соревнованиям. Рациональное распределение жиров, белков и углеводов помогают поддерживать спортсмена в тонусе.

Цель работы — составить оптимальную диету для ежедневного питания 13-15-летних волейболистов с учетом индивидуальных особенностей организма спортсменов.

Были проанализированы различные результаты исследований по рациону питания и тренировкам спортсменов за последние 10 лет.

Организация рационального питания спортсменов предполагает определенный режим, который включает в себя распределение приемов пищи в течение дня. Необходимо организовывать 4-5-разовое питание с интервалом между приемами пищи 2,5-3,5 ч. Повышение частоты приемов пищи, особенно в сочетании с возрастанием физических нагрузок в течение дня, приводит к более равномерному поступлению питательных веществ в организм. При этом под приемами пищи следует подразумевать также и употребление специальных продуктов спортивного питания и биологически активных добавок. После перенесенной болезни или травмы организм нуждается в витаминах и минералах.

Необходимо пить воду во время тренировки для нормального поступления кислорода ко всем клеткам организма, в частности, к жировым, чтобы не тормозить процесс жиросжигания.

Для юных волейболистов при одном тренировочном занятии в день распределение питания следующее: завтрак занимает 10% общей суточной калорийности (вареные яйца, каши, салат из морской капусты), второй завтрак – 25%, обед – 35% (суп-пюре или суп из овощей, мясо на пару), полдник – 5% (стакан кефира, настойка шиповника, орехи) и ужин – 25% (тушеные сердца, запеканка из овощей или творога).

При двух тренировках в день: завтрак – 5%, второй завтрак – 25%, обед – 35%, полдник – 5%, ужин – 30%.

При трех: завтрак – 15%, второй завтрак – 25%, обед – 30%, полдник – 5%, ужин – 25%. Суточная потребность в воде составляет от 2 до 2,30 литров. При этом спортсмену положено выпивать примерно 600 мл воды за 2 часа перед тренировкой и столько же в течении 2 часов после. Во время занятия рекомендуется пить жидкость, содержащую углеводы, а также подсоленную или обычную воду каждые 20 минут при сильных нагрузках.

Таким образом, была составлена оптимальная диета для ежедневного питания 13-15-летних волейболистов, учитывающая индивидуальные особенности организма спортсменов, позволяющая добиться высоких результатов на соревнованиях.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 612.825.1

В. С. Рычкова¹, С. Янакова², А. Р. Насретдинов¹,
Р. Н. Хазипов^{1,2}, П.-П. Ленк-Сантни²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

²Средиземноморский институт нейробиологии, г. Марсель,
Франция

veronika8d@rambler.ru

РОЛЬ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ В ГЕНЕРАЦИИ РАННИХ ОСТРЫХ ВОЛН В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ГИППОКАМПЕ КРЫС

Острые волны (ОВ) являются самым ранним в процессе развития организованным паттерном, регистрируемым в гиппокампе крыс *in vivo*. Известно, что у взрослых животных ОВ генерируются в

результате синхронного разряда CA3 пирамидных нейронов, распространяясь далее на нейроны CA1 области. Считается, что ОВ в гиппокампе взрослых животных принимают участие в консолидации следов памяти, а также в представлении и планировании траектории движения при навигации. В то же время механизм генерации и физиологическая роль ОВ у новорожденных животных (ранних ОВ) до конца не изучены.

С помощью многоканальных экстраклеточных электродов мы регистрировали локальный полевой потенциал и потенциалы действия отдельных нейронов гиппокампа новорожденных крыс в возрасте 2-7 дней после рождения во время ранних ОВ. Проведенный анализ амплитудно-временных характеристик ранних ОВ по клеточным слоям, лежащим на разной глубине гиппокампа, показал, что максимальная амплитуда локальных полевых потенциалов во время ранних ОВ наблюдается в лакунозно-молекулярном слое (*st. lacunosum-moleculare*). На этот же слой приходится максимальная плотность входящего тока (синк) во время острой волны, что не характерно для ОВ, регистрируемых в гиппокампе взрослых животных. Второй синк во время ранних ОВ наблюдался в лучистом слое гиппокампа (*st. radiatum*) по аналогии с ОВ у взрослых крыс. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что пусковым механизмом для генерации гиппокампальных ОВ может являться медиальная энторинальная кора (МЭК). МЭК является главными «воротами», через которые сенсорная информация различной модальности поступает в гиппокамп, и именно в лакунозно-молекулярном слое располагается афферентный вход от 3 слоя МЭК. Для того, чтобы проверить данное предположение мы определяли происхождение синков, отражающих процесс синаптической активации, наблюдаемых во время ранних ОВ. Для этого в гиппокампе новорожденных крыс регистрировали ответы на электрическую стимуляцию вентральной гиппокампальной комиссуры (CA3-CA1 вход) и волокна перфорантного пути (вход

из МЭК в гиппокамп). Анализ плотности источников тока во время ответов на электрическую стимуляцию вентральной комиссуры выявил синк в лучистом слое гиппокампа. При стимуляции волокон перфорантного пути наблюдались два синка, в лучистом и лакунозно-молекулярном слоях, что подтверждает участие МЭК в генерации ранних ОВ.

Таким образом, ранние ОВ, регистрируемые у новорожденных крыс *in vivo*, не являются исключительно интра гиппокампальными паттернами возникают при участии внешних входов из МЭК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Казанского (Приволжского) Федерального Университета и гранта РФФИ 17-04-02083.

Научный руководитель - Г. Р. Валеева, канд.биол.наук.

УДК612.825.1

А. О. Савосенков, Н. А. Григорьев, М. В. Лукоянов, С. Ю. Гордлеева

Нижегородский государственный университет

им. Н. И. Лобачевского

andrey.savosenkov@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ В НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЭКСПЕРИМЕНТ УПРАВЛЯЕМОЙ ОТ ИНТЕРФЕЙСА МОЗГ-КОМПЬЮТЕР ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ МАГНИТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Интерфейс мозг-компьютер(ИМК) – это технология, позволяющая обмениваться информацией между мозгом и исполняющими средствами, обрабатывая электрические сигналы с коры больших полушарий. Для улучшения данной технологии в контур ИМК включают обратную связь (ОС). Обычно ОС передается через рецепторы кожи (тактильная обратная связь), зрительные и слуховые анализаторы (визуальная, аудиальная обратные связи). Существует метод подачи обратной связи прямо в мозг, но эта технология имеет узкую область применения, т.к. является инвазивной и в исследовательских целях

чаще всего используется на обезьянах. Транскраниальная магнитная стимуляция является неинвазивным аналогом обратной связи в интерфейсах мозг-компьютер.

В этом исследовании был выбран тип интерфейса мозг-компьютер, использующий событийно-связанную десинхронизацию μ -ритма. В одной записи в случайном порядке комбинировались 2 типа стимулов: представление движения левой рукой и представление движения правой рукой.

Длительность предъявления команд составляла 2 секунд с межстимульным интервалом 5 секунды. В течение записи для каждой задачи в случайном порядке предъявлялось по 15 стимулов. Испытуемые, успешно освоившие методику воображаемых движений принимали участие в дальнейшей этапе, в котором контур нейроинтерфейса дополнялся обратной связью, осуществляемой посредством неинвазивной магнитной стимуляции сенсомоторных областей больших полушарий коры головного мозга. Катушка стимулятора располагалась над зоной $Cp3$ по системе 10-20. Также для получения контрольных данных было осуществлено изменение положения койла относительно точки стимуляции на сенсомоторной коре и перенос его в зону Cz (над продольной щелью большого мозга).

Дальнейший этап эксперимента представлял собой всего 6 записей: 2 записи с использованием ТМС как обратной связи, 2 записи без обратных связей (которые использовались в качестве дополнительного контроля) и 2 записи с ложной стимуляцией. В каждой записи предъявлялось 20, длительностью по 1.5 секунды с межстимульным интервалом 5 секунды.

Таким образом, получены статистически значимые различия степени десинхронизации относительно престаимульного периода при классификации состояний (воображаемые движения правой и левой руками). Не выявлено достоверно значимых отличий в точности классификации при использовании транскраниальной магнитной стимуляции в качестве обратной связи.

Научный руководитель – С. Ю. Гордлеева, канд. физ.-мат. наук.

УДК 612.349

К. В. Соколова¹, А. В. Белоусова², Т. С. Булавинцева^{1,2}

¹ *Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург*

² *Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург*

kssokolova@bk.ru

ПОВРЕЖДЕНИЯ ИНСУЛИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Актуальность исследования определяется широким распространением заболеваемости сахарным диабетом в мире. В работе произведена сравнительная оценка особенностей повреждения инсулин-синтезирующих клеток в экспериментальных моделях диабета первого и второго типов.

Цель исследования. Оценить повреждения инсулин-продуцирующей системы поджелудочной железы при диабете I типа (СД1) (аллоксановая модель) и II типа (СД2) (стрептозотоцин-никотинамидная модель).

Исследование проводилось на половозрелых крысах – самцах Wistar. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1 - интактные; 2 - животные с аллоксановым диабетом (аллоксан вводился в суммарной дозе 30 мг/100 г); 3 - животные, которым моделировался СД2 введением стрептозотоцина (65 мг/кг) в сочетании с никотинамидом (110 мг/кг). Животных выводили из эксперимента на 60 сутки. В крови определяли уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c) и инсулина. На срезах поджелудочной железы подсчитывали количество островков Лангерганса, островковых и внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток (ИСК). Определяли оптическую плотность инсулина в ИСК клетках панкреатических островков.

В периферической крови животных групп № 2 и 3 отмечалась характерная для СД1 и СД2 гипергликемия, уменьшение содержания инсулина по сравнению с теми же показателями группы №1. HbA1c был повышен только у животных с аллоксановым диабетом.

Морфометрическое исследование поджелудочной железы у группы крыс № 2 позволило установить достоверное снижение количества

панкреатических островков. Клеточность островков снижалась, причем за счет катастрофической гибели β -клеток. Сохранившиеся β -клетки обладали сниженной функциональной активностью. Подсчет внеостровковых ИСК выявил уменьшение количества клеток, собранных группами (агломератов). Количество одиночных протоковых и ацинарных ИСК клеток соответствовало значениям группы №1.

В группе № 3 повреждение островков было менее выражено, а процент β -клеток в островке и суммарное количество β -клеток на единицу среза значительно превышало значения в группе №2. Секреторная активность инсулиноцитов соответствовала норме. Количество ИСК клеток практически соответствовало интактным животным, исключение составляло некоторое снижение числа протоковых клеток, синтезирующих инсулин.

При обоих типах диабета имеют место деструкция островков поджелудочной железы, проявляющаяся отёком стромы и разрушением β -клеток. Сохранение числа внеостровковых ИСК в экспериментальной модели диабета 2 типа, по-видимому, может способствовать увеличению количества инсулина в крови и сохранению ткани железы в целом.

Исследование поддержано грантом РФФИ №16-15-00039.

Научный руководитель – И.Г. Данилова, д-р биол. наук, проф.

УДК 591.181:612.822.3

Е.О. Тарасова, А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

cate1990@list.ru

РОЛЬ КАЛЬПАИНА И КАЛЬЦИНЕЙРИНА В РЕГУЛЯЦИИ ВЫЗВАННОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО- МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

Работа нервно-мышечных синапсов тонко регулируется профилем кальциевых сигналов на самых разных этапах, в том числе и на этапе высвобождения медиатора из нервного окончания в ответ на потенциал действия. Однако непосредственные молекулярные каскады с вовлечением различных кальций-зависимых ферментов в моторных

синапсах млекопитающих до сих пор являются предметом активных исследований.

Данная работа проводилась на «рассечённом» нервно-мышечном препарате диафрагмы (*m. diaphragma - n. phrenicus*) мыши, помещённой в раствор Лайли для теплокровных животных. Внутриклеточную регистрацию миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли при помощи стандартной микроэлектродной техники. Для изучения ритмической активности синапсов стимулировали диафрагмальный нерв короткими (1 сек) пачками сверхпороговых импульсов (50 Гц). На основе зарегистрированных данных рассчитывали квантовый состав (КС) ПКП как отношение скорректированной на нелинейную суммацию амплитуду ПКП к средней амплитуде МПКП.

В первой серии экспериментов мы ингибировали работу кальций-зависимой цистеин-протеазы кальпаина при помощи PD150606 (100 мкМ). На фоне данного ингибитора КС каждого ПКП в залпе увеличивался по сравнению с контролем приблизительно на 30%. Такой значительный прирост КС ПКП по ходу залпа напоминал картину, наблюдающуюся при ингибировании другого кальций-зависимого фермента – фосфатазы кальцинейрина. Подавление её активности при помощи различных ингибиторов (CsA 1 мкМ, CN412 2,3 мкМ) также приводило к увеличению КС ПКП в залпе и усилению вызванной секреции АХ. Было показано, что при этом происходит растормаживание входа Ca^{2+} по L-типу каналов, так как увеличение КС ПКП полностью предотвращалось нитрендипином (1 мкМ) – блокатором L-типа Ca^{2+} -каналов.

В связи с широким и частично перекрывающимся спектром мишеней данных ферментов, было интересно проследить изменения активности нервно-мышечных синапсов на фоне ингибирования как кальцинейрина, так и кальпаина. К тому же, показано, что кальпаин может отщеплять фрагменты кальцинейрина, тем самым способствуя появлению кальций-независимой формы данной фосфатазы.

Оказалось, что на фоне усиления секреции АХ при ингибировании кальцинейрина при помощи CsA (1 мкМ) подавление активности кальпаина приводит к снижению КС ПКП вплоть до контрольных значений – (для ПКП1 КС составил $27,24 \pm 1,67$ ($n=15$) в контроле, $33,91 \pm 1,11$ ($n=22$, $p < 0,05$) на фоне CsA и $26,82 \pm 1,19$ ($n=15$, $p < 0,05$) при последующем действии PD150606).

То есть, в то время как при нормальной залповой активности синапсов протеолитическая активность кальпаина, по всей видимости, тормозит вызванный выброс медиатора, в условиях появления дополнительного входа кальция при ингибировании кальцинейрина активность кальпаина может становиться решающей для обеспечения усиленной секреции АХ.

При этом выявление непосредственных мишеней кальпаина является задачей дальнейших исследований, причём отдельным вопросом остаётся возможность взаимного влияния кальпаина и кальцинейрина при разных режимах работы нервно-мышечных синапсов.

Научный руководитель – О.П. Балезина, д-р биол. наук, проф.

УДК612.822.3 + 612.825.54

А.А. Федотова¹, М.В. Славуцкая^{1,2}

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

² *Научный центр психического здоровья, г. Москва*

fedotova.brain@gmail.com

ТОРМОЗНЫЙ КОНТРОЛЬ САККАДИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ В ПАРАДИГМЕ “GO/NOGODELAY”

Саккады выступают в качестве удобной модели для исследования процессов торможения как важнейшего компонента когнитивного контроля двигательного поведения человека. Целью данной работы являлся поиск ЭЭГ маркеров произвольного торможения.

В исследовании приняли участие 20 здоровых испытуемых-правшей 18–26 лет с нормальным и/или скорректированным зрением. Особенностью “Go/No go delay” парадигмы являлось наличие длительной межстимульной паузы (2800–3000 мс) между периферическим сигнальным и целевым стимулом. Схема содержала два типа целевых стимулов, которые с 50 % вероятностью могли быть либо разрешающими (“Go”), на которые следовало совершить саккаду, либо тормозными (“Nogo”), на которые взор переводить не следовало. Во время эксперимента регистрировали движения глаз (электроокулограмму), а также электроэнцефалограмму (ЭЭГ) с 25 отведений. Измеряли величину латентных периодов (ЛП) правильных и ошибочных саккад, а также параметры компонентов ERPs на целевые стимулы—амплитуду (А) и латентность пиков (ПЛ). В данной работе анализировали компонент P1. Для выделения компонентов ERPs использовали метод прямого когерентного усреднения ЭЭГ.

У всех испытуемых зарегистрировано 4 типа ответов: саккада на “Go” и отсутствие саккады на “No go” стимулы (правильные ответы), а также саккада на “No go” и отсутствие саккады на “Go” стимулы (ошибочные ответы, 10,4 %). Средний ЛП правильных саккад составил $426,8 \pm 1,8$ мс. Показано общее уменьшение ЛП ошибочных саккад по сравнению с правильными: на $134,0 \pm 11,0$ мс для саккад влево и на $115,2 \pm 11,6$ мс для саккад вправо ($p < 0,001$). Для ошибочных ответов обнаружено уменьшение ЛП саккад влево на $21,8 \pm 17,4$ мс ($W = 0,00028$; $Z = -3,16$, $p = 0$). Эти данные подтверждают представление о природе ошибочных движений как о рефлекторном ответе саккадической системы на зрительный стимул в результате включения непроизвольного внимания. Индивидуальная латентность пика компонента P1 варьировала от 70 до 164 мс. Мы обнаружили достоверное снижение амплитуды P1 на $3,2 \pm 0,1$ мкВ в ответ на предъявление тормозного “Nogo” стимула по сравнению с “Go” стимулом ($p = 0,0008$). Картирование амплитуды ЭЭГ с шагом 8 мс показало широкую генерализацию фокусов максимума

амплитуды P1 по коре. Локализация фокусов P1 во фронтальных и центрально-теменных латеральных и медиальных отведениях отражает включение лобно-теменных сетей саккадического контроля и внимания, а также медио-таламической системы внимания. У большинства испытуемых фокусы P1 занимали правое полушарие ($Z = -2,627$; $p = 0,0086$), доминирующее в процессах торможения. Для тормозных (“No go”) условий показано восходящее (“bottom-up”) распространение потенциала P1 из теменно-затылочных зон во фронтальные ($Z = -2,59$; $p = 0,0096$).

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о включении торможения на этапе сенсорной оценки стимулов. Компонент P1 в парадигме “Go/No go delay” может рассматриваться в качестве ЭЭГ маркера процессов торможения. Проведение аналогичного исследования с участием больных шизофренией позволит расширить имеющиеся представления о природе торможения и его взаимосвязи с вниманием, поскольку для таких пациентов характерно нарушение тормозного контроля.

Научный руководитель – М.В. Славуцкая, д-р биол. наук.

УДК 612.741.1

А.О. Федянин, И.Д. Львова, Н.В. Гелимуллина, Н.Ф. Ахметов

Казанский федеральный университет

artishock23@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОМОТОРНОГО АППАРАТА ИКРОНОЖНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

Изучали функциональное состояние нейронных сетей спинного мозга при 7-суточной гравитационной разгрузке. Показано, что параметры вызванных магнитной стимуляцией моторных потенциалов икроножной мышцы отличались от таковых, регистрируемых в контроле. Оценивали эффекты электромагнитной

активации поясничного локомоторного центра спинного мозга при гравитационной разгрузке на функциональное состояние спинальных нейронных сетей крысы. В условиях 7 суточной гравитационной разгрузки в сочетании с ежедневной электромагнитной активацией поясничного локомоторного центра спинного мозга также отмечали достоверные изменения регистрируемых параметров. Для выявления эффектов электромагнитной активации эфферентных структур спинного мозга в условиях гравитационной разгрузки провели сравнение характеристик вызванных моторных потенциалов, регистрируемых в икроножной мышце животных, находившихся в условиях антиортостатического вывешивания в сочетании с ежедневной электромагнитной стимуляцией с параметрами ответов икроножной мышцы крыс, находившихся в условиях антиортостатического вывешивания без стимуляции спинного мозга. Обнаружено, что электромагнитная активация поясничного локомоторного центра при гравитационной разгрузке приводила к увеличению порогов регистрируемых электрических потенциалов, латентного периода вызванных моторных потенциалов регистрируемых при стимуляции пояснично-крестцового отдела спинного мозга и длительности вызванных моторных потенциалов при стимуляции области шейного утолщения спинного мозга.

Снижение амплитуды и увеличение длительности вызванных моторных потенциалов, на наш взгляд, могут свидетельствовать о десинхронизации процессов распространения возбуждения по эфферентным путям, включая периферические звенья нейромоторного аппарата.

Известно, что время центрального моторного проведения отражает функциональное состояние внутриспинальных структур, обеспечивающих проведение возбуждения. Регистрируемое снижение времени центрального моторного проведения может быть связано с активацией в этих условиях процессов облегчения и увеличением эффективности проведения и передачи возбуждения в

следующих структурах двигательной системы: двигательные пути спинного мозга, мотонейроны, двигательные корешки.

Увеличение порога, латентного периода и длительности вызванных моторных потенциалов икроножной мышцы крыс в условиях сочетания микрогравитации с ежедневной электромагнитной активацией спинального поясничного локомоторного центра и приближение показателей к уровню контроля, очевидно, указывает на положительный эффект стимуляции спинного мозга. Вероятно, в этих условиях, изменения паттерна моторики в меньшей степени влияют на состояние центральных структур двигательного аппарата и/или компенсируются электромагнитной стимуляцией. Работа выполнена при поддержке РФФИ-15-04-05951а.

Научный руководитель: А.А. Еремеев, канд. биол. наук, доцент.

УДК 612.816:612.822.2

В. Ф. Хузахметова¹, Н. Н. Хаертдинов²

¹*Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*

²*Казанский (Приволжский) федеральный университет*
venerik87@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ КРЫС ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Высокий уровень гомоцистеина (ГЦ) в крови вследствие нарушения процесса реметилирования этой аминокислоты или превращения ее в цистеин из-за стресса, недостатка витаминов группы В, а также генетических патологий, приводит к развитию гипергомоцистеинемии (гГЦ). Подобный дефект является одним из факторов развития сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного

диабета, а также неврологических расстройств, таких как болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз. ГЦ может модулировать внутриклеточную сигнализацию, генерируя активные формы кислорода, окисляющие клеточные липиды, и влиять на работу синаптических белков. При гГЦ образуются вредные метаболиты (пероксиды, альдегиды, кетоны, спирты), которые являются ключевыми факторами инициации атеросклероза, рака и нейродегенеративных заболеваний. Также развитие гГЦ зачастую сопровождается изменением функций опорно-двигательного аппарата, что приводит к развитию мышечной слабости. Для того чтобы понять как при гГЦ изменяются синаптические процессы, мы исследовали амплитудно-временные параметры синаптических ответов и скорость проведения возбуждения в периферических синапсах при возникновении данного заболевания.

Эксперименты проводили на животных, развивающихся в условиях пренатальной гипергомоцистеинемии (пищевая нагрузка метионином крыс при беременности и во время молочного вскармливания). Потомство развивалось в условиях окислительного стресса, индуцированного повышенным уровнем гомоцистеина в плазме крови самки и формирующегося плода. Наличие развившейся гГЦ контролировали по содержанию гомоцистеина в крови животных. На изолированном нервно-мышечном препарате *m. diaphragm-n.phrenicus* регистрировали потенциалы действия нервного окончания и одноквантовые вызванные и спонтанные токи концевой пластинки (ТКП).

У новорожденных животных с гГЦ латентные периоды возникновения спайков в синапсах были значимо меньше, чем в синапсах контрольной группы этого же возраста и приближались к значениям, наблюдаемым у взрослых здоровых животных. Это свидетельствует о более высокой скорости проведения возбуждения по миелинизированной части аксона при развитии гГЦ. Также у новорожденных животных с гГЦ амплитуда спонтанных и вызванных ТКП была существенно выше по сравнению с ответами в синапсах

животных контрольной группы. У взрослых животных амплитуды сигналов в синапсах экспериментальной и контрольной групп достоверно не отличались. У модельных животных отмечались более короткие времена нарастания переднего фронта и постоянной времени спада спонтанных и вызванных ТКП по сравнению с контрольной группой, что говорит о более коротком времени жизни открытого ионного канала ацетилхолинового рецепторно-канального комплекса постсинаптической мембраны. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что амплитудно-временные характеристики постсинаптических ответов и скорость проведения возбуждения у новорожденных животных с гГЦ приближаются к параметрам, наблюдаемым у взрослых здоровых животных.

Поддержано грантом РФФИ 14-15-00618.

УДК 612.014.46

И.В. Черетаев, Д.Р. Хусаинов

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского,

Симферополь, Россия,

cheretaev86@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ АСПИРИНА НА ГАМК-ОБУСЛОВЛЕННУЮ СЕТЕВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА КРЫСЯТ

Известный препарат аспирин обладает угнетающим эффектом на импульсную активность нейронов и синаптическую передачу в ЦНС моллюсков. Предполагается, что данный эффект обусловлен тем, что аспирин может влиять на ГАМК-зависимые процессы в нейронах, снижая натриевые и увеличивая хлорные входящие ионные токи.

Цель работы – изучить на переживающих срезах ГАМК-обусловленную сетевую активность нейронов гиппокампа крысят под влиянием различных концентраций аспирина.

Эксперименты на лабораторных животных проводили в соответствии с директивой Евросовета и Европарламента от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях (Directive 2010/63/EU). После декапитации у крысят линии Wistar (возраст 4-8 дней) быстро извлекали мозг и помещали в охлажденный (4° С) и оксигенированный (95% O₂ и 5% CO₂) раствор искусственной цереброспинальной жидкости (aCSF), содержащей в мМ NaCl 126, KCl 3.5, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.3, NaHCO₃ 25, NaH₂PO₄ 1.2, глюкоза 11 (pH 7.4). Удаляли мозжечок и делали горизонтальные срезы гиппокампа толщиной 400 мкм на микротоме Thermo Scientific Microm HM 650 V. Затем срезы помещали в оксигенированный раствор aCSF и выполняли все процедуры обеспечения жизнеспособности клеток согласно официальным протоколам приготовления переживающих срезов гиппокампа крысят. Пэтч-кламп регистрацию сетевой активности пирамидных клеток CA3 области гиппокампа в режиме «whole cell» осуществляли с помощью усилителя Axopatch 200 B (Molecular Devices, USA) и под контролем микроскопа Axio ExaminerA1 (Carl Zeiss, Германия). Оцифровку сигнала осуществляли с помощью Digidata 1440 (Molecular Devices, USA). Для обнаружения в фоне и при действии аспирина (Медисорб, Россия) в концентрациях 0,001 и 0,01 моль/л ГАМК-обусловленной сетевой активности предварительно блокировали AMPA-каналы, добавляя 20 мкл CNQX во внеклеточный раствор. Использовали внутривнутрипеточный раствор с хлоридом цезия и протокол регистрации с фиксацией тока на -70 мВ. Результаты анализировали с использованием программных пакетов pClamp 10 (Molecular Devices, USA), Statistica 10.0 (StatSoft, USA) и Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA). Достоверность различий фона и эксперимента определяли с помощью непараметрического W-критерия Вилкоксона при $p \leq 0,05$.

Под влиянием аспирина в концентрации 0,001 моль/л (n=4) амплитуда ГАМК-обусловленных сетевых ответов увеличивалась по сравнению с фоном на 51,81 %, а в концентрации 0,01 моль/л (n=4) аспирин снижал амплитуду ответов на 65,68 %. В обеих концентрациях аспирин ускорял ГАМК-обусловленные сетевые ответы: длительность

ответов в фоне составляла $0,511 \pm 0,054$ с, а при действии аспирина – $0,062 \pm 0,008$ с ($0,001$ моль/л) и $0,046 \pm 0,002$ с ($0,01$ моль/л). Также в концентрации $0,01$ моль/л аспирин вызывал выраженное увеличение частоты ГАМК ответов с $0,11 \pm 0,03$ до $1,06 \pm 0,06$ Гц.

Таким образом, аспирин в концентрациях $0,001$ и $0,01$ моль/л оказывает активационное и синхронизирующее действие на сетевые ГАМК-обусловленные ответы. Этот эффект может играть ключевую роль в угнетающем действии препарата на нервные клетки.

Работа выполнена при поддержке проектов Программы развития КФУ им. В.И. Вернадского академической мобильности учёных «АММУР-2016» (ГСУ/2016/3) и «ПМР-2016» (ГСУ/2016/7), а также в рамках научной деятельности ЦКП «Экспериментальная физиология и биофизика».

Научные руководители – А.В. Яковлев, доцент кафедры физиологии человека и животных ИФМиБ КФУ, канд. биол. наук; Г.Ф. Ситдикова, заведующая кафедрой физиологии человека и животных ИФМиБ КФУ, профессор, д-р биол. наук.

УДК 612.8.04

К.А. Чернова, Г. Ф. Бурханова, Е.В. Герасимова, Г.Ф. Ситдикова

Казанский федеральный университет

aksinia.92@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ФЛУРОТИЛ- ВЫЗВАННЫМ СУДОРОГАМ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭТАНОЛА

Фетальный алкогольный спектр нарушений объединяет целый ряд нейроповеденческих дефектов, возникающих на этапе внутриутробного развития человека в результате употребления алкоголя во время беременности, основными факторами развития которого являются массивный нейроапоптоз в развивающемся головном мозге. Одним из осложнений фетального алкогольного спектра нарушений является эпилепсия, причиной которой является повышенная возбудимость СА3 области гиппокампа, обнаруженная *in vitro*. Целью нашей работы было

исследование влияния введения этанола на возникновение флуротил-индуцированной судорожной активности у новорожденных крыс.

Эксперименты проводились на новорожденных крысах линии Вистар возрастной группы 8–9 постнатальных дней с соблюдением этических норм по работе с лабораторными животными, принятыми в Казанском Федеральном университете. Были сформированы 2 группы животных: 1 – контрольная группа (n=6), 2 - этанольная группа (n=5). Этанол вводили внутривентрикулярно в концентрациях 6 гр/кг за 12 часов до начала эксперимента. Контрольным животным вводился физ. раствор того же объема. Тестирование проводили следующим образом: экспериментальных и контрольных новорожденных крыс помещали в воздухонепроницаемую камеру и проводили видеорегистрацию поведения в течении 30 мин; далее в камеру впрыскивали 100 мкл флуротила, который затем испарялся и образовывал судорожные пары. Видеорегистрация длилась 2 часа, после чего осуществлялось повторное введение флуротила в той же концентрации. Каждый тип возникающей активности оценивали в баллах в соответствии с шкалой Расина с небольшими модификациями для учета особенностей новорожденных животных: 1 – начальное возбуждение и повышенная исследовательская активность, 2 – подергивание головой и клонус передних конечностей, 3 – падение, дикий бег и прыжки, 4 – падение, плавательные движения с последующим тонусом, 5 – тонико-клонические припадки.

Было показано, что флуротил-индуцированные судороги у этанольной группы возникают быстрее, чем у контрольной. Латентный период до начала судорожной активности при первой подаче флуротила составил $81,7 \pm 23,1$ сек. в контрольной и $34,2 \pm 10,2$ сек. в этанольной, а при второй подаче $71,7 \pm 9,4$ сек. и $40,1 \pm 5,4$ сек. соответственно ($p < 0,05$). При первой подаче флуротила в контрольной группе только у 33% животных наблюдались тонико-клонические припадки (5 тип), а в этанольной - у 80% животных, а при повторной подаче флуротила 5 тип активности наблюдался у 50% животных контрольной и 80% животных - этанольной групп. 4 тип активности при первой подаче флуротила у животных контрольной группы не проявлялся, тогда как в этанольной фиксировался у 60% животных, а при повторной подаче флуротила наблюдался у 17% контрольных и в 80% этанольных животных. Общая длительность всех

видов флуротил-индуцированных судорог составила $90,7 \pm 22,1$ сек у контрольной и $182,1 \pm 24,7$ сек. у этанольной группы.

Научный руководитель – Е.В. Герасимова, доцент, канд. биол. наук.

УДК 612.825.1

Л. С. Шарипзянова, Д.С. Сучков, Р. Р. Галимуллина,
М.Г. Минлебаев

Казанский федеральный университет

Средиземноморский институт нейробиологии INMED

lyaisharip10@yandex.ru

ЗАВИСИМОСТЬ ВЫЗВАННОГО СЕНСОРНОГО ОТВЕТА В БОЧОНКОВОЙ КОРЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ОТ СКОРОСТИ ОТКЛОНЕНИЯ ВИБРИССЫ

Соматосенсорная система играет важную роль в адаптации и выживании животного. Например, благодаря чувствительным усикам - вибриссам, находящимся на мордочке животного, грызуны получают информацию о находящихся впереди препятствиях. Каждая вибрисса имеет свое собственное кортикальное представительство - бочонок. Совокупность бочонков, получающих сенсорные входы от вибрисс, образует бочонковую кору, являющейся местом обработки сенсорной информации. Для понимания механизмов кодирования сенсорной информации у взрослых животных активно изучаются такие параметры как скорость и амплитуда отклонения вибриссы. Однако, остается неизвестным используются ли одни и те же принципы кодирования сенсорной информации у взрослых и новорожденных животных, то есть являются ли механизмы кодирования сенсорной информации врожденными или приобретаются в ходе развития животного.

Мы попытались ответить на этот вопрос. Было проведено исследование влияния скорости и угла отклонения вибриссы на вызванный сенсорный ответ в бочонковой коре у новорожденных крыс во время первой постнатальной недели. Для этого использовалась стимуляция вибрисс с разными скоростями отклонения на один и тот же угол. Вызванная электрическая активность регистрировалась в

соответствующем, стимулируемой вибриссе, кортикальном бочонке, который был заранее определен методом регистрации внутреннего оптического сигнала.

Анализ мультинейрональной активности (МНА) показал, что при уменьшении скорости отклонения вибриссы наблюдается уменьшение, а затем и исчезновение вызванной МНА. Кроме этого, был также проведен спектральный анализ локального полевого потенциала (ЛПП) вызванного сенсорного ответа. Наблюдалась ярко выраженная положительная зависимость между скоростью отведения чувствительной вибриссы и мощностью вызванного ответа в альфа/бета спектральном диапазоне. Однако, анализ не показал значимой корреляции гамма ритмов активности и скорости отведения вибриссы. По мере уменьшения скорости отведения вибриссы, исчезла строгая привязка начала осцилляций к моменту стимула.

Полученные результаты предполагают, что критические значения скоростей и углов отведения чувствительных вибрисс у новорожденных крысят отсутствуют. Можно предположить, что критический угол отклонения вибриссы является приобретенным свойством соматосенсорной системы и появляется в процессе развития соматосенсорной системы во время взросления животного. Работа поддержана РФФИ №16-15-10174.

Научный руководитель – М.Г. Минлебаев, канд.мед.наук.

Секция биофизика

УДК 53.047

С. А. Герасимова, А. В. Лебедева, М. А. Мищенко, В. Б. Казанцев

Нижегородский государственный университет

им. Н.И.Лобачевского

gerasimova@neuro.nnov.ru

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙРОНОПОДОБНОГО ГЕНЕРАТОРА И ЖИВЫХ ВОЗБУДИМЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ ОПТОЭЛЕКТРОННОГО ИНТЕРФЕЙСА

Разработка устройств, позволяющих осуществлять взаимодействие с живыми электровозбудимыми клетками, является одной из наиболее перспективных междисциплинарных задач современной науки и техники. Такие устройства представляют интерес для развития медицинских приложений: разработки интерфейсов для мониторинга функционального состояния и воздействия на нейроны мозга; инженерных задач, таких как разработка оптических и электронных устройств управления протезами, создание нейрочипов-имплантов.

В этой работе представлен эксперимент по осуществлению стимуляции живых нейронов среза гиппокампа мозга крысы с помощью сигнала с нейроноподобного генератора.

Нейроноподобный генератор демонстрирует качественное сходство в динамике с основными динамическими режимами нейронов: наличие порога возбуждения, наличие возбудимого и автоколебательного режимов с возможностью переключения между ними.

Была разработана и реализована схема оптоволоконной связи между электронным нейроном ФитцХью-Нагумо и живыми нейронами. Выходной сигнал с генератора ФитцХью-Нагумо преобразовывался в оптическое излучение светодиодам, проходил по оптоволоконному каналу и детектировался фотодиодом. Электрический сигнал фотодиода поступал

на стимулирующие электроды, расположенные в переживающем срезе гиппокампа мозга крысы.

Для регистрации возбуждающих постсинаптических потенциалов (потенциалы от дендритов пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа) подавались несколько стимулирующих сигналов от нейроноподобного генератора. В ходе экспериментов была подобрана необходимая амплитуда стимулирующего сигнала (от 2В до 3В), подача которого вызывала возбуждение нейрональных клеток в гиппокампе.

Предлагаемый подход имеет принципиальное значение для построения оптоэлектронных систем малых размеров, которые за счет преобразования оптической несущей в электрический сигнал и биосовместимости оптоволоконна могут быть использованы для стимуляции живой электровозбудимой ткани без необходимости генетических модификаций в экспериментах на лабораторных животных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-32-00643 мол_а.

УКД 577.344.3

А.А. Горохова¹, Н.Н. Пескова¹, И.В. Балалаева¹

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского

anastasiya-dosaeva@yandex.ru

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ СЕНСОР NUPER, И АНАЛИЗ ПРОДУКЦИИ H₂O₂ В ОТВЕТ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в реализации противоопухолевого эффекта фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии (ФДТ), запуская окислительные процессы в клетке. Кроме этого, к настоящему времени накопилось достаточно данных, на основании которых можно утверждать о сигнальных функциях кислорода, которые осуществляются через АФК. Особое

внимание уделяют пероксиду водорода, H_2O_2 , который активирует клеточные сигнальные каскады и выступает в качестве вторичного мессенджера. С этой точки зрения, актуальными являются исследования динамики продукции пероксида водорода в различных клеточных компартментах при фотодинамическом воздействии в режиме реального времени.

Благодаря созданию генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков, были решены многие проблемы по изучению продукции АФК в живых системах. НуPer является первым флуоресцентным генетически кодируемым сенсором белковой природы, который позволяет регистрировать динамику изменения H_2O_2 на уровне целого организма, клетки или отдельного клеточного компартмента.

В рамках работы методом липофекции нами были получены стабильно трансфицированные линии клеток с экспрессией сенсора НуPer в разных клеточных компартментах: митохондриях и цитоплазме. Проанализированы параметры ростового цикла полученных линий A431 НуPer-mito и A431 НуPer-cyto с таковыми родительской линии A431 (эпидермоидная карцинома человека).

Определены показатели темновой и световой токсичности в отношении всех линий клеток для фотосенсибилизаторов хлоринового ряда ("Фотодитазин", ООО "Вета-Гранд, Россия) и фталоцианинового ряда ("Фотосенс", ФГУП ГНЦ "НИОПИК", Россия) и показано, что трансфекция не оказала существенного влияния на устойчивость клеток.

Полученные линии клеток были использованы для мониторинга изменения локальной внутриклеточной концентрации пероксида водорода при фотодинамическом воздействии в режиме реального времени. Данный подход осуществлен ратиометрическим методом с использованием конфокальной микроскопии. В течение длительного времени после кратковременного светового воздействия происходит увеличение интенсивности соответствующего показателя флуоресценции, что свидетельствует о постепенном увеличении

концентрации пероксида водорода в клетках после светового воздействия. С использованием созданных линий получены сведения о динамике содержания пероксида водорода в различных компартментах клетки в зависимости от дозы и режима воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (договор № 14.Z50.31.0022, проект гМК 980.2017.4).

Научный руководитель – И.В. Балалаева, канд. биол. наук, доцент.

УДК 57.03; 577.15

Солдатова Ю.В., Жиленков А.В., Трошин П.А.,

Арешидзе Д.А., Котельникова Р.А.

¹ *Институт Проблем Химической Физики РАН, г. Черноголовка*

soldatovayv@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ПЕНТААМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНООКСИДАЗ

Работа посвящена исследованию влияния ряда пентааминокислотных производных фуллерена C₆₀ (GI-349, GI-364, GI-376, GI-377, GI-379, GI-396, и GI-400) на каталитическую активность ферментов моноаминоксидаз А и В (МАО-А, МАО-В). МАО катализируют реакции окислительного дезаминирования биогенных аминов. МАО-А отвечает за дезаминирование серотонина и норадреналина, поэтому этот фермент является терапевтической мишенью при лечении клинической депрессии и тревожности. МАО-В является одним из ключевых ферментов, обеспечивающих метаболизирование дофамина в мозге, и его ингибирование позволяет пролонгировать эффекты синаптического дофамина, что и определяет использование ингибиторов МАО-В при терапии нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера.

Известно, что производные фуллерена обладают широким спектром биологической активности, в том числе проявляют нейропротекторное действие: способны ингибировать действие ацетилхолинэстеразы, предотвращать формирование β -амилоидных фибрилл, предупреждать

гибель нейронов, оказывать выраженное стимулирующее действие на центральные дофаминовые рецепторы, а также потенцировать АМРА рецепторы. Таким образом, водорастворимые производные фуллерена C₆₀ представляются весьма перспективными кандидатами для создания эффективных препаратов нового поколения для терапии нейродегенеративных расстройств.

Показано, что соединения GI-349, GI-364, GI-376, GI-377 и GI-400 в концентрации 10⁻⁵ М достоверно снижают каталитическую активность MAO-B в гомогенате головного мозга мышей, что может приводить к усилению синоптической передачи и, следовательно, улучшению когнитивных функций. Наиболее выраженным эффектом обладает соединение GI-377, которое ингибирует MAO-B на 65%.

Установлено, что все исследуемые соединения, за исключением GI-396, ингибируют MAO-A, что свидетельствует об их потенциальной способности оказывать антидепрессивный эффект. Сильное ингибирующее действие проявляют соединения GI-364, GI-376, GI-377, GI-379. Наиболее эффективный ингибитор GI-400, который снижает каталитическую активность фермента на 88%.

Изучалась кинетика влияния фуллереновых производных на реакцию дезаминирования бензиламина и серотонина, катализируемую MAO-B и MAO-A, соответственно, в гомогенате головного мозга мышей. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии ингибитора и без него оценивали в обратных координатах Лайнуивера-Берка. Было показано, что соединение GI-377 является конкурентным ингибитором MAO-B с константой ингибирования $K_i=2.78 \cdot 10^{-6}$. При изучении механизма ингибирования фермента MAO-B соединением GI-400 было установлено, что данное производное фуллерена неконкурентно ингибирует MAO-A с константой ингибирования $K_i=1.13 \cdot 10^{-5}$ М.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ мол_а № 16-34-01067 и Программы РАН № 9 ОХНМ “Биомолекулярная и медицинская химия 2017”.

Научные руководители: канд. физ.-мат. наук Котельникова Р.А., канд. биол. наук Арешидзе Д.А.

УДК 577.3

С. С. Сорокина, А. Е. Мальков, Л. В. Шубина,

С. И. Заичкина, О. М. Розанова

Институт теоретической и экспериментальной

биофизики РАН, Пущино

sv0723@yandex.ru

ДЕЙСТВИЯ УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА НА КОГНИТИВНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ У МЫШЕЙ *IN VIVO*

Изучение механизмов лучевого воздействия на когнитивные функции человека является важной фундаментальной задачей радиобиологии.

Цель работы - исследование действия ионов углерода на когнитивную деятельность в экспериментах на мышах.

Эксперименты проведены на 2х-месячных самцах мышей (SHK, 32 г). Облучение пучком ядер углерода с энергией 450 МэВ/н в пике Брэгга в дозе 0.7 Гр осуществлено в помещении ВРБС на У-70 (г. Протвино). Через 2 месяца после облучения использован набор тестов для оценки общей активности, пространственного обучения, долговременной и кратковременной гиппокамп-зависимой памяти (открытое поле, лабиринт Барнса, распознавание нового объекта). После оценки когнитивной деятельности проведен гистологический анализ дорзального гиппокампа для оценки его морфологического состояния (окраска по Ниссля) и поздних признаков нейрональной дегенерации (флуоресцентная окраска FJB).

В результате проведенных экспериментов показано, что в группе облучённых животных по сравнению с контролем значительно снижена общая активность в тесте «открытое поле», свидетельствующая о развитии состояния тревожности. Обе группы животных продемонстрировали хорошее обучение в течение 3 дней в лабиринте Барнса, однако, в тесте долговременной памяти контрольные животные показали меньшее число ошибок в нахождении «норки»-мишени по

сравнению с экспериментальной группой. Методом окрашивания по Нисслио выявлено снижение количества клеток в дорзальном гиппокампе в группе облучённых животных, причём наиболее выраженное уменьшение плотности клеток наблюдалось в хилусе зубчатой фасции экспериментальной группы. Кроме того, достоверно снижалась длина поля САЗс дорзального гиппокампа, и несколько уменьшалось количество клеток в нём. Эксперименты с применением *FJB* показали, что через два месяца после облучения у животных не наблюдалось *FJB*-положительного окрашивания в дорзальном гиппокампе. Таким образом, наличие гибнущих клеток как в экспериментальной, как и в контрольной группах, не обнаружено.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что мыши, облученные ускоренными ионами углерода в дозе 0.7 Гр, проявляют измененную модель поведения, характеризующуюся тревожностью и дефицитом гиппокамп-зависимой памяти, однако, без нарушений эпизодической памяти.

УДК 577.1

Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, А. В. Бычкова,
А. Е. Бугрова, М. И. Индейкина

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской
академии наук, Москва*

mourimotonari91@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ ФИБРИНОГЕНА

Фибриноген – крупный гликопротеин, циркулирующий в плазме крови всех позвоночных животных и являющийся предшественником фибрина. Превращение фибриногена в фибрин является ключевой физиологической реакцией, обеспечивающей процесс свертывания крови. Молекулы фибриногена чрезвычайно уязвимы для реакционноспособных видов кислорода (АФК) по сравнению с другими белками плазмы крови. Окислительные модификации молекулы фибриногена влияют на

гемостаз в силу изменения пространственной структуры и функции фибринового геля, приводя к коагулопатиям.

Было проведено исследование влияния индуцированного свободнорадикального окисления на структуру фибриногена методом масс-спектрометрии с использованием различных окислителей. Обнаружены сайты окисления, предположительно, имеющие влияние на структуру и функции фибриногена.

При анализе результатов нашей работы также было сделано предположение о том, что ряд легко окисляемых аминокислотных остатков, входящих в структуру фибриногена, могут выполнять антиоксидантную функцию, перехватывая молекулы АФК и защищая тем самым от окислительного повреждения другие ключевые в функциональном отношении аминокислотные остатки белка. α С область, вероятно, является структурой, экранирующей функционально важные части молекулы от воздействия активных форм кислорода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 16-14-00181.

Научные руководители – М. А. Розенфельд, д-р биол. наук, А. В. Бычкова, канд. хим. наук.

Секция Биохимия.

УДК 577.2

М. Ю. Баркина, Н. А. Смирнова, П. В. Веланский,

Э. Я. Костецкий, Н. М. Санина

Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

marybarkin@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАЦИИ НА СОСТАВ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВИДОВ ГЛИКОЛИПИДОВ МОРСКИХ МАКРОФИТОВ *ULVA LACTUCA* И *SACCHARINA JAPONICA*

Морские макрофиты (макроводоросли и травы) – продуценты органического вещества и кислорода в Мировом океане и ценный

пищевой и фармацевтический ресурс. Изучение механизмов их адаптации важно для понимания последствий глобальных климатических изменений, а также для развития *марикультуры*. Ключевым механизмом в процессах температурной адаптации морских макрофитов является регуляция физического состояния липидов клеточных мембран, которое чаще всего характеризуют составом их жирных кислот (ЖК). Однако важно, как распределены ЖК в гетерогенной смеси молекулярных видов этих липидов. В связи с тем, что в литературе практически отсутствует информация о составе молекулярных видов полярных липидов большинства морских макрофитов, целью настоящей работы было сравнительное исследование состава молекулярных видов главных липидов фотосинтетических мембран моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерола (ДГДГ) и сульфохиновазилдиацилглицерола (СХДГ) из двух широко распространенных видов морских макрофитов *Ulva lactuca* (Chlorophyta) и *Saccharina japonica* (Ochrophyta) при быстром (1 сутки) и медленном (7 суток) понижении температуры морской воды с 19 °С до 4 °С. Холодовую акклимацию водорослей, собранных летом в Японском море, проводили в аквариуме.

Анализ состава молекулярных видов, выполненный с помощью высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, показал, что главными в составе МГДГ и ДГДГ как у *U. lactuca*, так и *S. japonica* являются молекулярные виды с двумя полиненасыщенными ЖК (ПНЖК) (ПНЖК/ПНЖК), тогда как в составе СХДГ преобладают молекулярные формы, включающие насыщенные (НЖК) и мононенасыщенные (МНЖК) ЖК: НЖК/ПНЖК и НЖК/МНЖК.

При 7-суточной акклимации наблюдалось постепенное снижение содержания ПНЖК/ПНЖК форм МГДГ *S. japonica* при увеличении доли НЖК/МНЖК и НЖК/ПНЖК форм, что может способствовать значительному повышению вязкости тилакоидных мембран и служить механизмом ингибирования фотосинтетической активности растений при понижении температуры. Однако при 1-суточной акклимации значительных изменений не было обнаружено.

В составе МГДГ *U. lactuca* достоверных изменений не выявлено при обеих скоростях акклимации. Однако, в составе ДГДГ *U. lactuca* при понижении температуры происходило значительное увеличение содержания форм МНЖК/ПНЖК при снижении ПНЖК/ПНЖК. Изменения в составе ДГДГ *S. japonica* носили более хаотичный характер, но прослеживалось увеличение общей доли форм ПНЖК/ПНЖК и МНЖК/ПНЖК. Изменения в составе СХДГ как у *U. lactuca*, так и у *S. japonica* были незначительными. В целом, изменения в составе молекулярных видов гликолипидов *S. japonica* имеют более выраженный, но менее адекватный характер по сравнению с таковыми *U. lactuca*, что, возможно, связано с различной длительностью их жизненных циклов, а также с более стрессовыми условиями обитания ульвы в мелководной зоне.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект N 14-50-00034). Часть исследований, связанных с анализом состава гликолипидов, была поддержана Минобрнауки РФ в рамках госзадания № 6.5736.2017 / 6.7.

Научный руководитель – Н. М. Санина, д-р биол. наук, проф.

УДК 577.152.3

Л. К. Букуру¹, Е. В. Скворцов¹, Т. В. Багаева¹

¹ *Казанский федеральный университет*

blysechrista@yahoo.fr

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ В-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ПРИРОДНЫХ ГРИБОВ

В настоящее время, ферменты широко применяются в различных отраслях народного хозяйства. Особенно широко и актуально их применение в пищевой, фармацевтической, молочной промышленности и в других областях биотехнологических производств. Анализ данных литературы по исследованиям, связанным с изучением гидролитических ферментных препаратов, используемых в пищевой промышленности, показывает, что

ферменты β -галактозидазы, в настоящее время, являются наиболее привлекательными для производства безлактозных или низколактозных молочных продуктов. β -галактозидаза (КФ 3.2.1.23) катализирует гидролиз лактозы на галактозу и глюкозу. Способность к синтезу данного фермента широко распространена у различных микроорганизмов. Однако наиболее перспективными в отношении получения и использования β -галактозидазы в производстве являются микромицеты продуценты, секретирующие фермент в культуральную жидкость. Однако актуальным направлением данных исследований является поиск новых штаммов грибов, продуцирующих фермент β -галактозидазу.

Цель работы: Скрининг штаммов грибов по способности к биосинтезу фермента β -галактозидазы.

В работе использовали культуры микромицетов (*Trichoderma asperellum* 302, *Penicillium crustosum*, *Penicillium steckii*) музея культур микроорганизмов кафедры Биохимии и биотехнологии ИФМиБ, КФУ, и микромицетов *Alternaria alternata* и *Alternaria solani*, полученные из кафедры альгологии и микологии МГУ. Культивирование грибов проводили на КГ среде в течение 5 суток при 28 °C. Мицелий удаляли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин. Затем в культуральной жидкости определяли β -галактозидазную активность и концентрацию белка. Субстратом для определения активности β -галактозидазы служил 1% раствор лактозы, растворённой в 0.1 М ацетатном буфере pH 5.0. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров измеряли при 540 нм, на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ. Их концентрацию определяли по калибровочному графику, построенному по глюкозе. Концентрацию белка определили по методу Лоури.

Результаты исследования показали что, наибольшая β -галактозидазная активность наблюдалась у штаммов рода *Penicillium* и *Alternaria*. У *Alternaria alternata* β -галактозидазная активность составляла 3.25 МЕ/мл с общей концентрацией белков 1.45 мг/мл; т.е. удельная активность фермента, соответствует 2.241 единиц. У *Penicillium steckii* β -галактозидазная активность составляла 2 МЕ/мл при общей концентрации белков 7.6 мг/мл, что соответствует 0.263

ед. удельной активности фермента. Активность у *Penicillium crustosum* составляла 1.3 МЕ/мл, общая концентрация белков 2.475 мг/мл; удельная активность - 0.525 единиц. Для штаммов *Trichoderma asperellum* 302 и *Alternaria solani* обнаружена очень низкая активность β -галактозидазы.

Научный руководитель – Т. В. Багаева, д-р биол. наук, проф.

УДК 577.112.4

А.Д. Васильева¹, А.Е. Бугрова¹, М.И. Индейкина¹,

А.С. Кононихин^{1,2,3}, Л.В. Юрина¹

¹*ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук, Москва*

²*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л.
Тальрозе Российской академии наук, Москва*

³*Московский физико-технический институт (государственный
университет), Долгопрудный, Московская область, Россия
alexandra.d.vasilyeva@gmail.com*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ ФИБРИНСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АКТИВАЦИИ

Плазменный фибринстабилизирующий фактор (рFXIII) является одним из ключевых белков системы свертывания крови. рFXIII является полифункциональным белком, основная и наиболее детально изученная функция которого заключается в ковалентном сшивании полипептидных γ - и α -цепей фибрина. рFXIII также оказывает антитромботическое действие путем ингибирования адгезии тромбоцитов к полимерам фибрина, имеет важное значение для поддержания беременности, участвует в заживлении ран и ангиогенезе.

Подобно многим другим белкам, циркулирующим в плазме крови, рFXIII может подвергаться окислительной модификации под

действием активных форм кислорода (АФК), что вызывает нарушение его структуры и функциональных свойств.

По данным масс-спектрометрии, окисление рFXIII приводит к модификациям аминокислотных остатков преимущественно по сайтам цистеина, метионина, триптофана и тирозина. Также показано, что доля модифицированных аминокислотных остатков в пептидах возрастает при частичной и полной активации фермента, предшествующей окислению. Детектируемость участков молекулы изменяется в зависимости от стадии активации фермента, на которой образец подвергали гидролизу. Можно предположить, что конформационная перестройка молекулы при активации приводит к повышению доступности функционально важных сайтов окислителям.

На основе результатов проведенного исследования предполагается наличие в молекулах белков, циркулирующих в плазме крови, легко окисляемых аминокислотных остатков, выполняющих антиоксидантную функцию, а также специальных структур, экранирующих важные участки молекул от воздействия свободных радикалов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-08188 а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского научного фонда 14-24-00114 П.

Научные руководители М.А. Розенфельд, д-р биол. наук, проф.; А.В. Бычкова, канд. хим. наук.

УДК 577.114.083+ 577.115.083

И.Ю. Компанеец

Новосибирский государственный университет

kompaneecivan@mail.ru

ОЛИГОСАХАРИДЫ И ЛИПИДЫ, НЕКОВАЛЕНТНО ПРОЧНО СВЯЗАННЫЕ С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА

Иммуноглобулины молока играют важную роль в обеспечении пассивного иммунитета новорожденных. Ранее было показано, что антитела молока прочно нековалентно связаны с олигосахаридами и липидами, что является одним из факторов, определяющих их биологическую активность. В связи с этим, особенности структуры таких олигосахаридов и липидов представляет особый интерес.

Комплексы нековалентно прочно связанных с антителами липидов и олигосахаридов разрушали в смеси хлороформ : метанол. Масс-спектрометрический анализ экстрагированных таким образом олигосахаридов и липидов выявил наличие соединений с мол. массами 1200-8600 Да. В литературе не описаны олигосахариды и липиды с такими мол. массами. Биохимическим анализом показано, что полученные липиды и олигосахариды не содержат пептиды, аминокислоты и сложные эфиры.

Иммуноглобулины молока наряду с каноническими функциями обладают также каталитическими свойствами. Удаление углеводного компонента от иммуноглобулинов молока приводило к снижению ДНКазной активности, но не влияло на амилолитическую и протеолитическую активности.

Работа поддержана грантами: Проект 1.7.15 Комплексной программы Сибирского отделения РАН (III.2П.1), РФФИ № 16-04-00603.

Научный руководитель – д-р хим. наук, проф. Г.А. Невинский.

УДК 577.151.042

Т. А. Кургина^{1,2}, Р. О. Анарбаев^{1,2}, О. И. Лаврик^{1,2}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины*

СО РАН, г. Новосибирск

²*Новосибирский государственный университет*

t.a.kurgina@gmail.com

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ
ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА
ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 *IN VITRO*
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

Поли (АДФ-рибозо)полимераза 1 (PARP1) – один из ферментов, регулирующий активность системы репарации ДНК. PARP1 связывается с повреждением ДНК, например, односторонним разрывом, и каталитически активируется. ДНК при этом выступает в роли кофактора. При этом фермент катализирует синтез поли(АДФ-рибозы), используя в качестве субстрата NAD⁺ и осуществляя таким образом посттрансляционную модификацию различных белков, в том числе самого себя. Принято считать, что отрицательно заряженный полимер поли(АДФ-рибозы) приводит к диссоциации PARP1 с ДНК за счёт электростатического отталкивания.

Данный фермент рассматривается как перспективная мишень для создания противораковых препаратов. Работа посвящена разработке тест-системы определения активности PARP1 в реальном времени. Нами изучено *in vitro* действие на активность PARP1 препарата олапариб - ингибитора PARP1, уже применяемого в клинике.

Для исследования активности PARP1 использовался метод флуоресцентной спектроскопии. В качестве ДНК-субстрата использовался короткий ДНК-дуплекс, несущий повреждение, и флуорофоркарбоксифлуоресцеин на 3' конце одной из цепей дуплекса. С помощью флуоресцентной метки мы детектируем активность PARP1 в реальном времени, поскольку она позволяет следить за анизотропией

флуоресценции. Уровень анизотропии отражает размер комплекса, образующегося при связывании ДНК с белком, а также позволяет отслеживать диссоциацию этого комплекса при поли(АДФ-рибозил)ировании.

С помощью разработанного нами метода была изучена активность PARP1 на ДНК-дуплексе, содержащем односторонний разрыв. Варьируя концентрацию фермента, мы определили константу диссоциации и константу Михаэлиса в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Данный метод был опробован для изучения ингибирования PARP1 олапарибом. Нами было изучено влияние данного соединения на связывание PARP1 с ДНК и диссоциацию этого комплекса в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования. Показано, что олапариб не влияет на связывание PARP1 с ДНК, но значительно ингибирует процесс поли(АДФ-рибозил)ирования и диссоциации. Таким образом, было показано, что данный метод можно использовать для исследования активности PARP1 в реальном времени и изучения действия ингибиторов данного фермента.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ по Программе повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Проект 5-100) и гранта РНФ 14-24-00038

Научный руководитель – О.И. Лаврик, д-р хим. наук, проф., чл.-корр. РАН.

УДК 577.121.7

А. Б. Мазина¹, С. А. Дмитриева², Ф.В. Минибаева^{1,2}

¹ Казанский федеральный университет

² Казанский институт биохимии и биофизики

abmazina@gmail.com

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ В РАСТЕНИЯХ

Аутофагия – внутриклеточный катаболический процесс деградации окисленных или поврежденных макромолекул, который способствует выживанию или программируемой гибели клеток. Активные формы кислорода (АФК) рассматриваются как основные сигнальные молекулы, участвующие в запуске аутофагии в эукариотических клетках. В клетках животных в регуляцию аутофагии вовлечены также активные формы азота (АФА), однако информация об индукции или подавлении аутофагии с помощью АФА противоречива. Роль оксида азота (NO) в индукции аутофагии во многом обусловлена синергичным действием АФА и АФК. Данные об NO-опосредованной регуляции аутофагии в клетках растений отсутствуют в литературе. В связи с этим, наша работа направлена на изучение эффектов NO-доноров на особенности аутофагии и редокс-статус в клетках корней проростков пшеницы.

Нами показано, что обработка интактных проростков пшеницы NO-донорами (1 mM KNO₂, 10 mM KNO₃, 10 мкМ спермин, 10 мкМ нитропруссид натрия (SNP)) приводит к увеличению уровня NO в клетках корней, что подтверждалось биохимическими методами и с визуализацией с использованием флуоресцентного красителя DAF-FM (λ_{ab} 495 нм / λ_{em} 515 нм). Применение NO-доноров индуцировало образование аутофагосом, визуализацию которых осуществляли при помощи конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного красителя LysoTracker Red (λ_{ab} 577 нм / λ_{em} 590 нм). Спермин, KNO₂ и SNP индуцировали образование аутофагосом уже при кратковременном (3 ч) воздействии, в то время как KNO₃

индуцировал образование аутофагосом только при длительном (16 ч) воздействии. Активация аутофагии при действии доноров NO не сопровождалась снижением жизнеспособности клеток, уровень которой оценивали с помощью красителя пропидия йодида (PI, λ_{ab} 537 нм/ λ_{em} 617 нм). Совместная обработка корней NO-донорами и ловушкой NO сРТЮ приводила к значительному снижению образования аутофагосом, что подтверждает специфичность вклада NO в индукцию аутофагии в клетках корней пшеницы.

Анализ редок-изменений показал, что активация аутофагии при действии NO-доноров приводила к увеличению содержания H_2O_2 , что, однако, не сопровождалось повышением уровня перекисного окисления липидов. Это свидетельствует о регуляторном, а не токсичном действии NO-доноров на клетки корней.

Известно, что аутофагия является энергозависимым процессом, АТФ необходим как на этапе формирования аутофагосом, так и для поддержания градиента рН этих кислых компартментов. Анализ энергетического состояния клеток корней при обработке растений донорами NO проводили путем оценки дыхательной активности клеток и уровня митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$). Запуск NO-опосредованной аутофагии сопровождался активацией работы митохондрий, что подтверждается изменением $\Delta\Psi_m$ и небольшим усилением потребления кислорода. Это может свидетельствовать о включении энергозависимых сигнальных каскадов при запуске аутофагии.

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что NO-доноры приводят к повышению уровня NO, накоплению АФК и индуцируют образование аутофагосом в клетках корней пшеницы. Выявление молекулярных механизмов, благодаря которым NO-доноры индуцируют аутофагию в растительных клетках, станет задачей наших последующих исследований.

Научный руководитель – Ф. В. Минибаева, д-р биол. наук

УДК 577.152.193:582.32

А.О. Онеле¹, А.В. Часов^{1,2}, Ф.В. Минибаева^{1,2}, Л.В. Викторова²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

²Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

donjay.ao@gmail.com

ПЕРОКСИДАЗЫ *DICRANUM SCOPARIUM* HEDW

Известно, что мхи обладают чрезвычайной устойчивостью к неблагоприятным условиям среды. Например, они способны выживать при потере большого количества воды. Такая феноменальная особенность сохранять жизнеспособность не должна была остаться без внимания стрессологов. Несмотря на очевидную важность, биохимические механизмы окислительно-восстановительных реакций в клетках мхов недостаточно изучены. Известно, что у высших сосудистых растений пероксидазы являются универсальными ферментами. Данный фермент использует H_2O_2 в качестве акцептора электронов при окислении или сшивки различных молекул. В определенных условиях, пероксидазы также могут образовывать активные формы кислорода (АФК). Вероятно, что пероксидазы мхов, как и пероксидазы сосудистых растений, являются одними из ключевых ферментов участвующих в стрессовых реакциях.

Нами показано, что у совместно произрастающих лесных мхов наивысшая активность наблюдалась у *Dicranum scoparium*. Активность пероксидазы была выше активности пероксидазы мхов *Hylocomium splendens* и *Pleurozium schreberi* более чем в 2 раза. Нами показано, что активность пероксидазы *D. scoparium* превосходила на 2 порядка активность каталазы и на 3 порядка активность фенолоксидазы. С помощью электрофореза у данного мха было выявлено 4 изоформы фермента и 13 изоформ с помощью изоэлектрофокусирования. Кинетический анализ активности

пероксидазы показал, что константа Михаэлиса понижалась в ряду: *p*-кумаровая кислота > кофейная кислота > *o*-дианизидин > 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) диаммониевая соль (ABTS), а максимальная скорость реакции повышалась в ряду: ABTS < *p*-кумаровая кислота < кофейная кислота < *o*-дианизидин.

Изоферменты пероксидазы были очищены с помощью ионно-обменной хроматографии. Обнаружено, что каждый мажорный изофермент с *pI* 4.6, 4.8, 5.1 после изоэлектрического фокусирования при последующем 2D-электрофоретическом разделении распадался на 2 изоформы с молекулярной массой 197 и 263 кДа, а изофермент с *pI* 4.0 был представлен лишь одной изоформой – 263 кДа.

С помощью акцепторного метода нами показано образование супероксидного анион-радикала во внутриклеточной фракции таллома дикранума. Специфичность метода подтверждалась внесением супероксиддисмутазы. Окрашивание полиакриламидного геля на супероксид продемонстрировало, что в его образовании принимают участие различные изоферменты пероксидазы.

Таким образом, наши данные показывают что, пероксидаза *D. scoparium* представлена множеством изоформ демонстрирующих как про- так и антиоксидантную активность. Можно полагать, что выявление особенностей структуры и функции пероксидаз моховидных, стоящих на более низкой эволюционной ступени развития, чем цветковые растения, может помочь в понимании происхождения и особенностей функционирования стресс-чувствительных пероксидаз сосудистых растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-04-01562) РФФИ и Правительства РТ (грант № 17-44-160142).

Научный руководитель – А. В. Часов, к.б.н., с.н.с. лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма КИББ КазНЦ РАН, ассистент ИФМиБ К(П)ФУ.

УДК 576.54.

А. Д. Пешкова, Ж. Ле Минь, И. А. Андрианова

Казанский федеральный университет

alinapeshkova@list.ru

ЧАСТИЧНАЯ РЕФРАКТЕРНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ТРОМБОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Тромбоциты играют важную роль в образовании тромбов различной локализации и связанных с ними нарушений гемодинамики и дисфункции тканей и органов. Помимо прокоагулянтной активности, способности к адгезии и агрегации, тромбоциты вызывают спонтанное сжатие, или контракцию, сгустков крови, которая осуществляется за счет сократительного аппарата активированных тромбоцитов, прикрепленных к волокнам фибрина. Вероятность образования тромбов и исход тромбоза в значительной степени обусловлены функцией тромбоцитов.

Целью работы было изучение функционального состояния тромбоцитов у пациентов с венозными тромбоэмболическими осложнениями (ВТЭО) и острым ишемическим инсультом (ИИ).

Материалы и методы. Тромбоциты выделяли из плазмы крови методом гель-фильтрации. С помощью метода сканирующей электронной микроскопии исследовали морфологические признаки активации тромбоцитов, выделенных из крови 4 пациентов с ВТЭО, 6 пациентов с ИИ и 7 здоровых доноров. Для каждого препарата тромбоцитов анализировали не менее 10 случайно выбранных полей; в общей сложности исследовали 4211 клеток при ВТЭО, 892 клетки при ИИ и 791 нормальную клетку. Степень активации тромбоцитов оценивали также проточной цитометрией по экспрессии Р-селектина (используя меченые флюорофором антитела к CD62p) и активного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (по связыванию меченого флюорофором фибриногена) до и после активации тромбиновым рецепторным гексапептидом (TRAP). Каждый образец тромбоцитов, выделенных

из крови 11 пациентов с ВТЭО и 11 пациентов с ИИ, исследовали цитометрически параллельно с контрольным образцом тромбоцитов здорового донора.

Результаты. При электронной микроскопии тромбоцитов доля клеток с филоподиями, которые являются морфологическим признаком активации, была больше у пациентов с ВТЭО (75%) и с ИИ (34%) по сравнению со здоровыми донорами (9%, $p < 0,0001$). Кроме того, у пациентов с ИИ доля спонтанно активированных тромбоцитов по уровню экспрессии Р-селектина была выше ($10 \pm 5\%$) по сравнению с донорами ($3 \pm 1\%$ $p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют об спонтанной гиперактивации тромбоцитов, циркулирующих в крови больных с ВТЭО и особенно ИИ.

В то же время реакция тромбоцитов из крови больных на стимуляцию под действием TRAP была ослаблена. У пациентов с ИИ и ВТЭО после химической стимуляции доля тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, была значительно меньше ($71 \pm 7\%$ и $30 \pm 7\%$ клеток, соответственно), по сравнению с нормальными тромбоцитами ($84 \pm 4\%$, $p < 0,0001$). Активация интегрин $\alpha IIb\beta 3$ в ответ на стимул также была существенно снижена при ИИ и ВТЭО ($43 \pm 7\%$ и $41 \pm 8\%$ клеток, соответственно) по сравнению с TRAP-активированными нормальными клетками ($60 \pm 7\%$ $p < 0,01$).

Выводы. При тромботических состояниях, таких как ВТЭО и ИИ, значительная часть тромбоцитов находится в состоянии хронической гиперактивации, что приводит к их истощению и дисфункции, проявляющейся в снижении ответа на физиологический стимул, т. е. рефрактерности и снижении активационного потенциала.

Работа выполнена в рамках программы Повышения конкурентноспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Научный руководитель: Р.И. Литвинов, д-р .мед. наук, проф.

УДК 579.835: 577.114: 612

А. К. Суркина¹, С. А. Коннова², Ю. П. Федоненко¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
surkina-ak@mail.ru

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM LIPOFERUM* SP59B, ВЫРАЩЕННЫХ НА РАЗНЫХ СРЕДАХ

Известна способность липополисахаридов (ЛПС), или эндотоксинов, и капсульных полисахаридов грамотрицательных бактерий стимулировать лейкоциты к синтезу многочисленных факторов воспаления. При правильном дозировании нативные и модифицированные гликаны непатогенных бактерий могут быть использованы в качестве эффективных иммуномодуляторов. Целью нашей работы было установление влияния условий выращивания на структуру и биологическую активность гликанов бактерий *A. lipoferum* Sp59b.

Бактерии выращивали на стандартной среде с малатом Na (соотношение C:N 2:1), а также на среде с фруктозой (соотношение C:N 10:1), причем, во втором случае варьировали источники азота в среде (KNO_3 и NH_4Cl) и время культивирования (24 и 72 ч). ЛПС выделяли из внешней мембраны бактерий водно-фенольной экстракцией по методу Вестфаля. С поверхности клеток 0.15 М раствором NaCl смывали капсулу, из которой гель-фильтрацией на Sepharose CL-4B получали липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК).

Анализ биополимерного состава показал, что увеличение времени выращивания приводило к накоплению углеводов в ЛПС и

ЛПБК, а использование NH_4Cl в среде повышало содержание белка в ЛПБК. Содержание фосфора во всех препаратах составило 3%. Данные электрофореза в ПААГ свидетельствуют о преобладании в ${}_{72}\text{ЛПС}_{\text{KNO}_3}$ молекул S-формы, в отличие от остальных гликанов, для которых было характерно равное содержание S- и R-форм. Анализ состава жирных кислот (ЖК) показал преобладание короткоцепочечных ЖК в ЛПС_{mal} . В остальных препаратах основными по содержанию были 3-ОН- $\text{C}_{14:0}$, 3-ОН- $\text{C}_{16:0}$ и $\text{C}_{18:0}$ ЖК.

Показано, что ${}_{72}\text{ЛПС}_{\text{KNO}_3}$ и ЛПС_{mal} обладали наибольшим стимулирующим эффектом в отношении индуцибельной NO-синтазы мышинных спленоцитов, в то время как ${}_{72}\text{ЛПС}_{\text{NH}_4\text{Cl}}$ не оказывал выраженного действия на активность фермента. В эксперименте по определению активности миелопероксидазы в мышинных перитонеальных макрофагах только ${}_{24}\text{ЛПС}_{\text{KNO}_3}$ и ЛПС_{mal} обладали стимулирующим потенциалом. Все препараты бактерий, выращенных на фруктозе, увеличивали синтез ФНО- α клетками цельной крови человека до 600–700 пг/мл против 1500 пг/мл, показанных для ЛПС_{mal} . Исключение составил ${}_{24}\text{ЛПБК}_{\text{NH}_4\text{Cl}}$, стимулирующий эффект которого был выше последнего. В отличие от ЛПС_{mal} , модифицированные гликаны в большей степени стимулировали синтез ИЛ-1 β , чем ФНО- α . При этом ${}_{24}\text{ЛПБК}_{\text{NH}_4\text{Cl}}$ обладал еще большей активностью, чем в тесте по определению ФНО- α (3250 пг/мл), что можно считать значительным стимулирующим эффектом. Как и в предыдущем эксперименте ${}_{72}\text{ЛПС}_{\text{KNO}_3}$ обладал самой слабой цитокинстимулирующей активностью (330 пг/мл).

Таким образом, манипуляции с условиями выращивания бактерий позволили получить препараты биополимеров, отличных по структуре и обладающих разной способностью стимулировать факторы естественной резистентности макроорганизма.

Научный руководитель: А.К. Суркина

УДК 577.122

Е. В. Шахристова, О. Л. Носарева, Е. А. Степовая
Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск
shaxristova@yandex.ru

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ
КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК
ЛИНИИ HBL-100 ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ РОСКОВИТИНОМ
ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

Актуальность данного исследования обоснована тем, что заболевания сопровождающиеся развитием окислительного стресса (ОС), в частности воспалительные, онкологические, сердечно-сосудистые и нейро-дегенеративные, на фоне дисбаланса процессов образования и утилизации активных форм кислорода (АФК), изменения состояния системы антиоксидантной защиты и активации окислительной модификации макромолекул, по прежнему представляют собой важную область исследований молекулярно-клеточных взаимодействий, позволяющих выявить фундаментальные механизмы развития социально-значимых патологий и разработать персонализированные подходы к их диагностике и терапии. Целью настоящего исследования являлось изучение уровня окислительной модификации белков (ОМБ) и его роли в нарушении пролиферации клеток эпителия молочной железы при окислительном стрессе, индуцированном розковитином (ROSC).

Эксперименты выполнены на культуре клеток эпителия молочной железы человека линии HBL-100, полученной из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Культивирование клеток проводили адгезионным методом в полной питательной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). В клетках линии HBL-100 при ОС, индуцированным ROSC (20 мкМ), оценивали распределение по фазам клеточного цикла (G0/G1, G2/M и S) методом проточной

цитофлуориметрии, интенсивность ОМБ – по концентрации карбонильных производных белков с использованием 2,4-динитрофенилгидразина. Интенсивность развития ОС определяли по продукции АФК в тесте с флуоресцентным зондом 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом и содержанию восстановленного (GSH), окисленного (GSSG) глутатиона. Результаты анализировали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что в клетках линии HBL-100 ROSC способствовал снижению пролиферации, что выражалось в уменьшении количества клеток в 1,2 раза ($p < 0,01$) в G0/G1 фазах, увеличении в 1,4 раза ($p < 0,01$) в G2/M и 1,1 раза ($p < 0,01$) S фазах по сравнению с интактной культурой. Так же, ROSC индуцировал развитие ОС в клетках эпителия молочной железы: возрастала продукция АФК в 1,4 раза ($p < 0,01$), концентрация GSSG – в 1,2 раза ($p < 0,05$) и снижалось содержание GSH в 2,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной культурой. На фоне развития ОС при действии ROSC в клетках линии HBL-100 нами выявлено увеличение (6,2 раза и 5,1 раза ($p < 0,01$)) уровня карбонильных производных белков в условиях спонтанного окисления протеинов при длинах волн 274 и 363 нм, по сравнению с уровнем ОМБ в интактной культуре. Образование карбонильных производных белков – нерепарируемый процесс и продукты свободнорадикального окисления протеинов способны потенцировать окислительные повреждения ДНК. Кроме того, при действии ROSC конформационные изменения различных белковых молекул (в том числе циклинзависимых протеинкиназ), вызванные карбонилированием, привели к нарушению выполняемых ими функций и остановке пролиферации клеток линии HBL-100.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гуманитарные и общественные науки) в рамках научного проекта № 17-36-01029.

Научные консультанты: д-р мед. наук, профессор Е. А. Степовая
д-р мед. наук, профессор, акад. РАН В. В. Новицкий

Секция Биотехнология.

УДК 577.113.3

A. S. Abdelbaki, I. A. Prokhorov, Yu. G. Kirillova and V. I. Shvets

Moscow Technological University, Institute of Fine Chemical

Technologies, 119571 Moscow, Russian. e-mail:

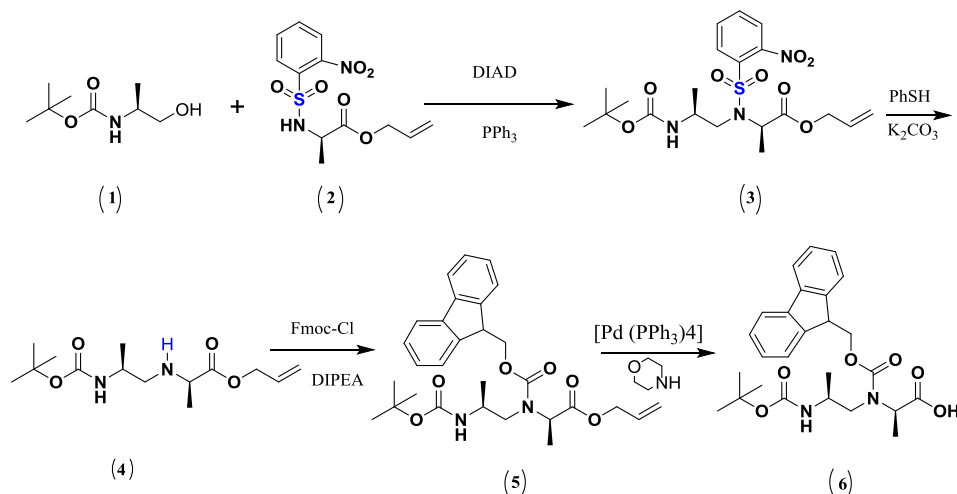
ahmed.abdelbaki@yandex.com

SYNTHESIS OF NEW CHIRAL PEPTIDE NUCLEIC ACID (PNA) MONOMER BY MITSUNOBU REACTION

Peptide nucleic acids (PNAs) are a promising class of nucleic acid mimics developed in the last two decades and were immediately found to be very excellent tools in binding DNA and RNA for diagnostics and gene regulation. Their use as therapeutic agents have been proposed since early studies and recent advancements in cellular delivery systems, and in the so called antigene strategy, make them good candidates for drug development. A number of modifications have been made to the PNA backbone to enhance binding affinity, solubility and cellular uptake. Addition of side chains at the α and γ -position of the PNA backbone has proven to be particularly successful, as this modification increases binding affinity by preorganizing the backbone, and enables a diverse range of chemical functionalities to be incorporated via simple amino acid building blocks.

In our studies, we have developed a new and convenient method of PNA monomer synthesis for obtaining a new structural modification of chiral peptide nucleic acids (PNAs) –two stereogenic centre in the position 2 and 5 (α and γ -dimethyl pseudopeptide L and D-alanine) (Scheme 1). It is known that in the literature, when the stereogenic centre is in position 2 the DNA binding is slightly favored by the D-configuration and when the stereogenic centre is in position 5 the situation is reversed and the DNA binding is much more favored by the L-configuration while the two stereogenic centre in the position 2 and 5 are simultaneously present the best DNA binding takes place. In addition to, this type of residue more

closely mimics a real peptide sequence, since the amino acid side chains will be spaced exactly as in natural oligopeptides, in this way PNAs could eventually be obtained, that is, molecules which not only have the DNA functionality but also the protein activity according to the amino acid side chains.



Scheme 1. Synthesis of the chiral PNA submonomer 6.

We synthesized PNA monomer having pendant methyl groups at α (*R*) and γ (*S*) sites on PNA backbone based on the Mitsunobu reaction; in case of the preparation of monomer for Boc protocol. We used as a starting compound *N*-Boc-amino alcohol (1). *N*-*o*-nitrobenzenesulfonyl protected amino acid allyl ester (2) was prepared by known procedures.

Using the new procedure we obtained protected PNA monomer backbone (3). The pseudopeptide secondary amine groups were then deprotected by thiolysis, and after appropriate work-up (4) was obtained, 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) group was inserted to obtain Fmoc-monomer (5), then the allyl ester was removed and the fully-protected monomer (6) obtained.

The results of our work suggest that, the above method allowed for the synthesis of new chiral PNAs with the high purity and high yield.

Scientific supervisor - V. I. Shvets, PhD, D.Sc. Prof., Acad. RAS.

УДК 577.113.3

Баутиста Хьюго¹, Ш. З. Валидов¹, Т. В. Багаева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

hbautistae@yahoo.com

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ БИОСУРФАКТАНТОВ ИЗ АМАЗОНСКИХ ДЖУНГЛЕЙ ЭКВАДОРА

Сегодня по всему миру отмечается тенденция повышения интереса к солюбилизирующей, эмульгирующей, антиадгезивной и детергентной активности веществ, синтезируемых микроорганизмами. Нефтяное (углеводородное) загрязнение природной среды является особенно опасным по сравнению с прочими химическими загрязнениями, что связано с высокой токсичностью и миграционной способностью отдельных компонентов нефти. В почве и в воде присутствие углеводородов вызывает долгосрочное неблагоприятное воздействие на живые организмы.

Цель настоящей работы – молекулярная идентификация новых продуцентов биосурфактантов с широким спектром функциональной активности, выделенных из амазонских джунглей Эквадора (Южная Америка).

Накопительные культуры, выращенные на среде Мюнца с внесением 1% сырой нефти и с последующей процедурой накопления клеток дали возможность для выделения шести нефтеокисляющих бактерий, способных использовать сырую нефть в качестве единственного источника углерода. Все они были очищены до монокультур. Два штамма бактерий, обладающих способностью расти в широком диапазоне температур от 10°C до 40°C; для которых были подобраны оптимальные условия для роста, исследовались в дальнейших экспериментах. Определение прироста биомассы культивируемых бактерий проводили методом определения КОЕ, выросших на агаризованной питательной среде МПА. Видовая

принадлежность штаммов была установлена с использованием MALDI TOF Biotyper. Данные бактерии были идентифицированы как *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis*.

Выделенные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis* были проверены на продукцию биосурфактантов, охарактеризованы в тестах по измерению эмульгирующей активности, определению изменения поверхностного натяжения и гидрофобности поверхности.

В экспериментах было установлено, что наиболее значимыми показателями в этом отношении обладал штамм *Bacillus subtilis*, оптимально растущий при температуре 35°C и имеющий показатель эмульгирующей активности (58%). После 30 суток культивирования данного штамма на МПБ нами был выделен и очищен комплекс биосурфактантов. Второй штамм, а именно *Pseudomonas aeruginosa*, обладал несколько сниженными характеристиками, но также был способен к синтезу биосурфактантов.

На основании полученных результатов штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis* можно рекомендовать для интродукции в природные объекты с целью борьбы с нефтезагрязнением.

УДК 665.948.1

М. Т. Видрашко, Я. Я. Тыньо, Г.В. Морозова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина

yutyinio@mail.ru

СКИПИДАРНЫЕ ЛИЗОЛИ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ

В настоящее время распространенным способом получения устойчивых дисперсий терпентинного масла и других скипидаров в водных средах является приготовление растворов скипидаров в воде посредством применения сложных составов. В медицине

используется только очищенный живичный скипидар: в составе мазей, в качестве адьюванта.

Цель работы — оценить устойчивость скипидарных лиозолей при разных способах приготовления с использованием медицинского и технического скипидаров в качестве дисперсной фазы.

Исследовали лиозоли, приготовленные по специальной методике с использованием медицинского и технического скипидаров в качестве дисперсной фазы и дистиллированной воды — в качестве дисперсионной среды (маточный лиозоль). Далее лиозоли фильтровали через полиэфирсульфонные фильтры с диаметром пор 200 нм, а затем разводили физиологическим раствором в соотношении 1:10; 1:100; 1:1000. Оценивали вязкость; индекс полидисперсности (PDI); размер частиц и дзета потенциал (по модели Смолуховского) лиозолей и скипидаров.

Установлено, что лиозоли, приготовленные с использованием медицинского скипидара, более устойчивы, чем приготовленные с использованием технического, что продемонстрировано большим по модулю дзета-потенциалом (-36,08 мВ для маточного лиозоля, содержащего медицинский скипидар, и -28,76 мВ — для маточного лиозоля, содержащего технический). Следует отметить значительные различия в вязкости медицинского и технического скипидаров (47,14 и 2,99 сСт соответственно). Маточные лиозоли характеризуются неоднородностью размеров частиц (PDI для маточных лиозолей, содержащих медицинский и технический скипидар, составляет 0,45 и 0,46 соответственно). Фильтрация лиозоля обеспечивает уменьшение среднего размера частиц за счет отсева более крупных частиц (потери масла составляют менее 5%), однако дальнейшее разбавление лиозоля физиологическим раствором приводит к коагуляции капель масла и, как следствие, увеличению среднего размера частиц. Размер частиц профильтрованного лиозоля, содержащего медицинский скипидар, до и после разбавления физиологическим раствором в соотношении 1:000 составляет 274,28 нм и 913,10 нм соответственно.

Для лиозолей, содержащих технический скипидар, размер частиц при тех же условиях приготовления составляет соответственно 249,68 нм и 846,06 нм. Отмечено, что при фильтрации лиозолей их дзета-потенциал падает в 2-3 раза, что также свидетельствует о невозможности длительного хранения лиозолей в профильтрованной форме.

Таким образом, была оценена устойчивость скипидарных лиозолей при разных способах приготовления с использованием медицинского и технического скипидаров в качестве дисперсной фазы. Установлено, что маточный лиозоль, содержащий медицинский скипидар, является более перспективным для дальнейшего изучения в связи с большей устойчивостью, а также более точным и стабильным составом, чем у лиозоля, приготовленного с использованием технического скипидара.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 57.083.22

М. С. Гавриш, С. А. Тутукова, Е. А. Епифанова, А. А. Бабаев

Нижегородский государственный университет

им. Н. И. Лобачевского

mary_gavrish@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН НЕЙРОТРОФИНА

Среди многих функций нейротрофинов описывается и их роль в широком спектре явлений, регулирующих деятельность как периферической, так и центральной нервных систем. Основным принято считать их участие в контроле физиологического развития нейроном, а также их дальнейшей фенотипической дифференциации. Особый интерес вызывает нейротрофический фактор головного мозга

(BDNF), способный стимулировать рост нейронов и их отростков не только в раннем онтогенезе, но и в мозге взрослого организма, что ранее считалось невозможным. BDNF оказывает и нейропротекторное действие, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного терапевтического агента коррекции ишемических и нейродегенеративных процессов в нервной ткани.

В настоящее время для доставки целевого гена широко используются аденоассоциированные вирусные вектора (AAV), основным преимуществом которых является обеспечение сильной локальной экспрессии гена интереса. Для оценки эффективности аденоассоциированной трансдукции и экспрессии в вектор внедрен ген mKate2.7 – мономерного дальнекрасного флуоресцентного белка, обладающего максимумами флуоресценции при длине волны 588 и 635 нм. Это позволит использовать сконструированный вектор совместно с другими для комплексного наблюдения процессов в нейрональных клетках.

Первоначально был сконструирован шаттл – вектор pAAV-Syn-BDNF-mKate2.7-kid2 под контролем синапсного промотора. Полученный плазмидный конструктор охарактеризовали методами рестрикционного анализа и полимеразной цепной реакции. Сборка самого вируса проходила производилась в клеточной культуре НЕК 293 FT при помощи хелперных плазмиды – DJ vector и pHelper, несущих гены Rep и Cap, которые не содержатся в шаттл – векторе, но обеспечивают правильное формирование капсида. Через 3 дня после трансфекции наблюдали развитие цитопатического действия накапливающего вируса после чего производили очистку и концентрирование на колонках Amicon Ultra-15 (Millipore). Тестирование вируса осуществлялось на клеточной культуре Neuro 2a.

Таким образом, нами был получен аденоассоциированный вирус, экспрессирующий нейротрофический фактор.

Научный руководитель – А. А. Бабаев, канд. биол. наук, доцент.

З. А. Ефременко, А. А. Приставка
Иркутский государственный университет
makar.efremenko@mail.ru

АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ *TRAMETES HIRSUTUS* НА РАЗНЫХ ИСТОЧНИКАХ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Промышленная деятельность ведет к масштабному накоплению лигноцеллюлозных отходов, которые, с одной стороны, являются поллютантами, а с другой – могут быть ценным ресурсом для производства различных продуктов. Перспективным является биотехнологическая переработка лигноцеллюлозы с использованием ксилотрофных грибов - возбудителей белой гнили, которые являются активными продуцентами ферментов лигноцеллюлазного комплекса.

В ходе работы была исследована способность *Trametes hirsutus* продуцировать внеклеточные лигниназы и целлюлазы при глубинном культивировании на разных видах растительного сырья: измельченная древесина (смесь опилок хвойных и лиственных пород), пшеничная солома, биомасса спирогиры (*Spirogyra* sp.) из оз. Байкал, отходы кофейного производства (шелуха от кофейных ягод). Грибной мицелий культивировали в стационарных условиях 10 суток в конических колбах при температуре 28 °С на среде Чапека-Докса, в которую добавлялся один из растительных субстратов в концентрации 0,5 %. В качестве контроля использовали среду без добавления лигноцеллюлозы.

Начиная с третьих суток в культуральной жидкости общепринятыми методами определяли активность лакказы, лигнинпероксидазы и общую целлюлазную активность.

Среды, содержащие спирогиру, солому и кофейную шелуху оказались наиболее благоприятными по составу для культивирования *T. hirsutus* - показано наибольшее накопление биомассы и ее устойчивый прирост за весь период наблюдений. Пик активности

всех ферментов на всех средах зафиксирован на 6-7 сутки с последующим снижением как абсолютных, так и удельных (в пересчете на белок) показателей.

Самая высокая целлюлазная активность отмечена на средах со спирогирой и соломой - 29,9 и 16,9 МЕ/мл соответственно, что в 3 и 1,5 раза больше, чем на среде с опилками. При этом удельная активность на среде с соломой в 2,5 раза выше, что объясняется высоким уровнем секреции белков, относящихся к ферментам целлюлазного комплекса.

Наибольшая же активность ферментов лигниназного комплекса отмечена на средах с опилками и кофейной шелухой. Активность лакказы и лигнинпероксидазы на этих субстратах в 2 и 4 раза выше, чем на среде со спирогирой и соломой. Самая высокая удельная активность этих ферментов так же характерна для среды с кофейной шелухой - в 3 раза выше, чем на среде с опилками.

Таким образом, соотношение различных групп внеклеточных ферментов *T. hirsutus* в значительной степени определяется соотношением растительных полимеров в субстрате: ряд «спирогира – солома – древесные опилки» характеризуется снижением доли целлюлозы и увеличением – лигнина, что закономерно отражается на соотношении активностей целлюлаз и лигниназ, продуцируемых грибом при выращивании на этих субстратах. Кофейная шелуха содержит в своем составе низкомолекулярные фенольные и полифенольные соединения (например, оксикоричная кислота – промежуточный продукт биосинтеза лигнина), которые, вероятно, являются более эффективным индуктором синтеза лигниназ по сравнению с полимерным лигнином. А высокое содержание фруктовых сахаров, флавоноидов, аминокислот и витаминов способствует эффективному росту грибов на данной среде.

Научный руководитель – доцент, канд. биол. наук, А. А. Приставка

УДК 577.13

Л. М. Залялютдинова, Р. И. Тухбатова, Т. В. Багаева

Казанский федеральный университет

L_Z_93@mail.ru

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
*TRICHODERMA ASPERELLUM F-1087***

Плесневые грибы рода *Trichoderma* являются эффективными продуцентами вторичных метаболитов широкого спектра действия. Вторичные метаболиты нашли свое применение в фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве, ветеринарии и других областях. В связи с наличием интереса ученых к изучению вторичных метаболитов грибов рода *Trichoderma*, работа является актуальной и имеет как практический, так и теоретический интерес.

Целью данной работы было исследование вторичных метаболитов плесневого гриба *Trichoderma asperellum F-1087*, выделенного из почв РТ.

Объектом исследования стал штамм *Trichoderma asperellum F-1087*, выделенный из почв РТ. Очищенная культуральная жидкость 12 суток роста была разделена на фракции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ хроматограммы показал, что в первой фракции содержатся полярные группы, двойные или тройные связи, благодаря меньшему связыванию с колонкой. Вторая фракция, соответственно, содержит вещества с большей гидрофобностью, и предположительно, единичной С-С связью. Масс-спектрометрический анализ позволил получить пики, зарегистрированные в диапазоне молекулярных масс 200-1800 Да. Фрагментирование метаболитов электрическим потенциалом и дальнейшая масс-спектрометрическая идентификация фрагментов показала наиболее вероятные участки последовательностей аминокислот в составе пептидов в порядке

убывания – KNG, HWL, RWL, RRWL, HLW. Цитотоксическая активность вторичных метаболитов исследовалась против клеточных линий РС-3 (клетки рака предстательной железы человека) методом МТТ-теста. В результате исследования был определен диапазон действующей концентрации метаболитов: 0.002–1.7 мг/мл. Концентрация полумаксимального ингибирования IC50=0.03169 мг/мл.

Проведение качественных реакций позволило подтвердить предположение о пептидной природе исследуемых метаболитов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что полученные метаболиты из культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* F-1087 являются пептидами молекулярной массы около 800 Da (8-10 аминокислотных остатков). Выживаемость опухолевых клеток РС-3 при действии на них метаболитами зависит от их дозы. При увеличении концентрации пептидных метаболитов *Trichoderma asperellum* F-1087 в среде, уменьшается выживаемость клеточных линий РС-3.

Научный руководитель - Т. В. Багаева, д-р биол. наук., проф.

УДК 579.66

А.С. Зорина, Ю.Г. Максимова ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
cjcyf_92@mail.ru

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ АМИДОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ БИОПЛЕНКАМИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Амиды карбоновых кислот являются одними из наиболее распространенных веществ химической промышленности, что сказывается на присутствии этих соединений в сточных водах. Широко известно, что амидные поллютанты токсичны и присутствие их в сточных водах строго нормируется. Поэтому в настоящее время особенно остро стоит вопрос об очистке сточных вод от простых амидов и их производных.

На сегодняшний день изолированы и селекционированы нитрилгидролизующие бактерии, характеризующиеся трансформацией широкого ряда амидных соединений до соответствующих карбоновых кислот. Это позволяет применять биопленки на основе нитрилгидролизующих бактерий в процессах очистки сточных вод от амидных соединений.

Объектом исследования являлись перспективные для биокатализа и биологической очистки штаммы *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus erythropolis* 11–2, обладающие выраженной амидазной активностью.

Биопленки выращивали на базальтовом волокне (4 мкм и 10-15 мкм в диаметре) и Карбопоне-Б-актив на минеральной среде в течение 7 суток, отмывали от среды калий-фосфатным буфером и использовали для трансформации акриламида. Реакцию трансформации акриламида в концентрации 100 мМ проводили в течение 30-5760 мин с перемешиванием на шейкере (скорость оборотов 140 об/мин), при температуре 22°C, реакцию останавливали добавлением концентрированной HCl в конечной концентрации 5 %.

Анализ динамики трансформации субстрата показал, что и биопленки *Al. faecalis* 2, и клетки в суспензии почти полностью трансформируют акриламид в среднем за 24 часа реакции. Ощутимой разницы во времени трансформации акриламида биопленками *Al. faecalis* 2, выращенными на базальтовом волокне разного диаметра и Карбопоне-Б-актив, не наблюдается. Биопленки *R. erythropolis* 11–2, выращенные на базальтовом волокне диаметром 4 мкм, трансформировали большую часть акриламида к 2 часам реакции; выращенные на базальтовом волокне 10-15 мкм – к 24 часам реакции. Свободные клетки *R. erythropolis* 11–2 в суспензии к 24 часам реакции трансформировали менее половины субстрата.

Анализ накопления продукта реакции показал, что и биопленки *Al. faecalis* 2, и клетки в суспензии накапливают акриловую кислоту в реакционной среде до определенного момента, после чего ее

концентрация начинает снижаться. Свободные клетки в суспензии *Al. faecalis* 2 накапливают большее количество кислоты и в меньшей степени ее утилизируют, чем биопленки этой же культуры. Причем наименьшее количество кислоты в реакционной среде наблюдалось у биопленок, выращенных на Карбопоне-Б-актив. Биопленки *R. erythropolis* 11–2 и клетки в суспензии накапливают примерно одинаковое количество кислоты, не потребляя ее в дальнейшем.

Таким образом, было показано, что для клеток *R. erythropolis* 11–2 наиболее выгодно использование биопленок в процессах очистки сточных вод, так как биопленки этого штамма быстрее свободных клеток в суспензии трансформируют субстрат в продукт реакции. Для клеток *Al. faecalis* 2 показана наилучшая степень очистки воды, не только от субстрата, но также и от продукта реакции, при выращивании их на носителе Карбопон-Б-актив.

УДК 578.74

А.А. Зыкова¹, В.В. Куприянов¹

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальных основ биотехнологии РАН, Центр «Биоинженерия» РАН, г. Москва

Nuta2109@gmail.com

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПОПЕТИДА В СТРУКТУРЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ПОВТОРОВ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ M2 БЕЛКА ВИРУСА ГРИППА НА ЕГО ИММУНОГЕННОСТЬ

Создание рекомбинантных противогриппозных вакцин, основанных на отдельных высококонсервативных эпитопах белков вируса гриппа является актуальной задачей вакцинопрофилактики гриппа. Внеклеточный домен высоко консервативного M2 белка (M2e) вируса гриппа, является перспективным для создания «универсальной» гриппозной вакцины в виде рекомбинантного белка. Сам пептид слабо иммуногенный. Одним из путей для

улучшения иммуногенности рекомбинантного белка является использование липопептидных последовательностей в его составе в качестве адъюванта. Липопептиды распознаются иммунной системой как сигнал опасности, индуцируя иммунитет посредством связывания с Толл-подобными рецепторами 2 (Toll-like receptor 2).

Целью нашей работы было изучение зависимости иммуногенности препаратов от наличия последовательности липопептида *Neisseria meningitidis* в рекомбинантных белках на основе повторов M2e пептида вируса гриппа человека.

Для экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E.coli* использовали вектор pQE30 (Qiagen). Очистку белков проводили на Ni-IDA-агарозе (Biontex). Полученные препараты анализировали методами электрофореза в нативных и денатурирующих условиях. Иммуногенность рекомбинантных белков проверяли на мышах Balb/c. Сыворотки оценивали, используя метод иммуноблоттинга и иммуноферментный анализ.

Были сконструированы гены, кодирующие рекомбинантные белки, которые включали четыре и восемь повторов последовательностей M2e пептида «человеческого» вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в сочетании со спираль-образующими линкерами, фланкирующими эти последовательности и отделяющие последовательности липопептида *N. meningitidis* на N- и C- концах. Эти гибридные белки были экспрессированы в клетках *E.coli*. и выявлялись в нерастворимой фракции после лизиса клеток с помощью обработки лизоцимом, замораживания-оттаивания и ультразвуком последовательно. Находящиеся в осадке белки растворяли в 7М гуанидин хлориде и очищали, используя металл-аффинную хроматографию.

В результате были подобраны условия для эффективной экспрессии рекомбинантных белков, содержащих 4 и 8 копий последовательностей M2e пептида и липопептид *N. meningitidis* на N- и C-концах. Иммунизация мышей очищенными препаратами

рекомбинантных белков, содержащих липопептид, обеспечила индукцию более высоких титров специфических антител.

Таким образом, включение липопептида *N. meningitidis* на N- и C-концах в рекомбинантных белках, содержащих спиральные линкеры и 4 или 8 копий M2e пептида, позволяет получить высокоиммуногенный препарат против вируса гриппа человека с самоадьювантными свойствами.

Научный руководитель – В.В. Куприянов, канд.биол.наук.

УДК 579.64

Д. Ю. Кулабухова¹, О. В. Ласточкина², С. Р. Гарипова¹

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского

хозяйства, г. Уфа

dariya.greatfire@mail.ru

ВЛИЯНИЕ *BACILLUS SUBTILIS* НА ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM L.*) К ДЕФИЦИТУ ВЛАГИ

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) - типичные представители микробиоты растительного организма, относящиеся к числу бактерий, стимулирующих рост растений (PGPB – Plant Growth Promoting Bacteria). Интерес к PGPB вызван их способностью интенсифицировать рост и развитие растения-хозяина, а также снижать его восприимчивость к биотическим и абиотическим стрессам. Ранее было показано, что *B. subtilis* 10-4 обладает высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Helminthosporium sativum*, а также оказывает защитный эффект на рост растений пшеницы (*Triticum aestivum L.*) и сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) в условиях дефицита влаги и инфицирования *Alternaria alternata*, соответственно. Однако,

влияние штамма *B. subtilis*10-4 на рост и развитие бобовых культур пока не изучено.

В связи с этим, целью данной работы явилось изучение влияния предпосевной обработки семян *B. subtilis*10-4 на параметры ростовых процессов гороха (*Pisum sativum* L.) как в нормальных условиях, так и при дефиците влаги, моделированном засолением(1% NaCl) и высокими концентрациями сахарозы (16 атмосфер).

Первоначально был проведен сравнительный анализ влияния *B. subtilis*10-4 в широком диапазоне концентраций (10^8 КОЕ/семя, 10^7 КОЕ/семя, 10^6 КОЕ/семя, 10^5 КОЕ/семя) на всхожесть и линейные размеры проростков гороха. Обнаружено, что обработка семян гороха *B. subtilis* 10-4 в различных концентрациях по-разному влияла на интенсивность ростовых процессов растений и во всех случаях была выше или сопоставима с контролем. Всхожесть семян, инокулированных *B. Subtilis* 10-4, увеличивалась на 15%, линейные размеры корней проростков – на 11-39%. Причем, наиболее эффективным по ростостимулирующему эффекту оказалось использование концентраций 10^7 и 10^5 КОЕ/семя. Далее представляло интерес оценить способность *B. Subtilis* 10-4 индуцировать устойчивость гороха к дефициту влаги как к одному из наиболее распространенных абиотических стрессовых факторов среды. Было обнаружено, что засоление приводит к снижению всхожести на 36-50%. В то же время, обработка гороха *B. subtilis*10-4 в концентрации 10^5 КОЕ/семя обеспечивала увеличение всхожести на 31% в условиях засоления. Аналогичные данные были получены и при использовании в качестве стресса высокой концентрации раствора осмотика (сахароза, 16 атм.), где обработка семян гороха штаммом *B. subtilis*10-4 привела к увеличению всхожести на 7%.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что штамм *B. subtilis*10-4 в концентрации 10^5 КОЕ/семя индуцирует устойчивость гороха к дефициту влаги, интенсифицируя рост проростков гороха.

Научный руководитель - С. Р. Гарипова, канд. биол. наук, доцент

УДК 54:542.05:547

А.А. Курилова, С.В. Козлов

Саратовский государственный аграрный университет

им. Н.И. Вавилова

kurilovanastya2015@icloud.ru

**РАЗРАБОТКА ИННОВАЦИОННОГО БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА НА ОСНОВЕ
СЕЛЕНОПИРАНОВЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ВЫЖИВАЕМОСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Известно, что 4Н-селенопирановые структуры используются в качестве ветеринарных и медицинских препаратов. Однако биологическая активность тетрагидро-4Н-селенохроменов до настоящего времени не изучена. В связи с вышесказанным, целью нашей работы явилось получение 2-(4-хлорфенил)-4-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-4Н-селенохромена и изучение его некоторых биодинамических свойств.

Исследования выполняли на базе ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. В соответствии с целью исследования был синтезирован 2-(4-хлорфенил)-4-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-4Н-селенохромен с выходом 88%. На начальном этапе изучения общетоксических свойств препарата проводили: оценку острой токсичности соединения, раздражающего действия и иммунотоксичности, изучение терапевтической активности и антиоксидантных свойств синтезированного соединения на модели токсического повреждения печени четыреххлористым углеродом (CCl₄). Доклинические исследования выполняли согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010 г.) и методическим указаниям с «Руководством по проведению

доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012). Статистическую обработку результатов проводили по стандартным процедурам.

В результате проведенных исследований было установлено, что LD₅₀ при парентеральном введении мышам-самцам селенохромена составляет 13640,74±2103,49 мг/кг и, согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, относится к 4 классу опасности (нетоксичное вещество). Кроме того, синтезированное соединение не оказывает раздражающего действия на кожу и на слизистую оболочку глаза лабораторных животных, не оказывает ни стимулирующего, ни ингибирующего действия на иммунную систему, не обладает цитотоксическим эффектом. В индуцированном четыреххлористым углеродом экспериментальном остром гепатите на лабораторных животных было установлено следующее. При визуальной оценке печени у животных, получавших в качестве терапии селенохромен (подопытная группа 1), препарат сравнения (подопытная группа 2) и комбинацию этих веществ (подопытная группа 3), изменения в печени были незначительны и близки к физиологически здоровым животным. гематологический и биохимический анализ крови животных показал, что у всех подопытных групп изменения, отмеченные у животных без проведения терапевтических мероприятий (группа контроля), незначительны и приближены к норме. Также при измерении концентрации глутатиона в гомогенате печени отмечается увеличение концентрации последнего в подопытных группах 1, 2 и 3 по сравнению с контролем в 3,46, 4,23 и 5,77 раз соответственно и по сравнению с физиологически здоровыми животными в 1,30, 1,58 и 2,14 раз соответственно.

Научный руководитель – С.В. Козлов, канд. ветеринар. наук, доцент

УДК 579.695 + 579.222 + 579.66

Н. А. Лучникова¹, К. М. Черемных^{1,2}

¹*Пермский государственный национальный исследовательский университет*

²*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН*

luchnikova.n@mail.ru

ДЕТОКСИКАЦИЯ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АКТИНОБАКТЕРИЙ

Дегидроабиетиновая кислота (ДАК), детектируемая в составе сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности в высоких (до 500 мг/л) концентрациях, является одной из наиболее распространенных в природе токсичных смоляных кислот. По литературным данным, основные показатели острой токсичности ДАК по отношению к различным тестовым организмам составляют от 0,1 до 6,5 мг/л. В связи с этим необходим поиск экологически безопасных методов детоксикации ДАК, основанных на использовании ферментативной активности микроорганизмов.

Одной из активно изучаемых групп биодеструкторов являются актинобактерии экологически значимых таксонов, способные деградировать труднодоступные органические соединения в высоких концентрациях.

В работе использовали 45 штаммов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegmtcol, реестровый номер Уникальной научной установки 73559). Бактериальные культуры выращивали в условии периодического культивирования в минеральной среде с добавлением дрожжевого экстракта,

микроэлементов и 0,1 об.% *n*-гексадекана. ДАК добавляли через 48 ч с начала эксперимента в концентрации 500 мг/л. В отдельных экспериментах использовали ингибиторы оксигеназ в концентрации 1 мМ.

В результате проведенных исследований отобраны коллекционные штаммы *Dietzia maris* ИЭГМ 55^T и *Gordonia rubriperctincta* ИЭГМ 107, проявляющие по отношению к ДАК наибольшую устойчивость (МПК 390 и 780 мг/л соответственно). Установлено, что полное разложение 500 мг/л ДАК клетками *D. maris* ИЭГМ 55^T и *G. rubriperctincta* ИЭГМ 107 в присутствии *n*-гексадекана в качестве дополнительного ростового субстрата происходит в течение 7 суток. Внесение ДАК в среду культивирования актинобактерий вызывает повышение уровня респираторной активности в течение всего процесса биодеструкции. С использованием различных ингибиторов оксигеназных ферментов подтверждено участие цитохром Р450-зависимых монооксигеназ в процессе актинобактериальной биодеструкции ДАК. Полученные данные расширяют представление о каталитической активности актинобактерий и их возможном вкладе в деконтаминацию природных систем от экотоксикантов.

Исследования выполнены в рамках расширенного государственного задания по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО.

Научные руководители – И. Б. Ившина, д-р биол. наук, акад. РАН; В. В. Гришко, канд. хим. наук.

УДК 58.085

K. V. Malakhova, E. V. Maramokhin

Federal State Educational Institution «Kostroma State University»,
malakhova.kv1@gmail.com

SOME FEATURES OF INTRODUCTION TO CULTURE *IN VITRO* VARIETY FORMS *CORYLUS AVELLANA* (L.) H. KARST

One of the most valuable plant resources is common hazel (*Corylus avellana* (L.) H. Karst.). It finds application in the food and pharmacological industry. In the leaves of the hazel there is taxol and a number of biologically active substances (betulin, myricetin, quercetin, kaempferol, quercitrin, afzelin), which have preventive and therapeutic effects in diseases of the gastrointestinal tract, anemia, capillary hemorrhages, malaria, skin diseases. In this connection, there is a need to grow this crop on an industrial scale. The method of clonal micropropagation allows obtaining a healthy high-quality planting material *C. avellana* for its subsequent plantation. The problem of introducing into culture *in vitro* *C. avellana* is its high contamination, which at the stage of introduction into the culture suppresses the viability of explants. The purpose of this work is: optimization of the technology of introduction into the *in vitro* culture of hazel common for its subsequent clonal micropropagation.

As donor explants we used meristematic tissues obtained from vegetative bud buds. The primary disinfection of the plant material was carried out with a 0.5% solution of potassium permanganate. Two sterilization regimes were used to sterilize donor explants: 1) aging of plant material in 70° ethyl alcohol (1 minute) followed by 3% sodium hypochlorite (10 minutes); 2) keeping the plant material in 70° ethanol (1 minute) followed by 3% sodium hypochlorite (15 minutes). After the plant material was placed twice in a container with distilled water for 5 minutes to wash the sterilizing agents.

To cultivate *C. avellana* under in vitro conditions, we used two types of culture media: Murasige-Skooga (MS) and Driver-Kuniyuki Walnut (DKW) supplemented with 100.0 mg/l meso-inositol, 2 mg/l glycine, 0.5 mg/l thiamine, 0.5 mg/l pyridoxine, 20 mg/l sucrose, 5.0 mg/l agar. 6-BAP and NAA were used as growth regulators in a concentration of 1.0 mg/l and 0.1 mg/l.

The second mode of sterilization of donor explants showed the most effective results: the share of sterile morphogenic explants was 20%, at the same time the share of sterile non-morphogenic explants was 15%, the share of non-sterile explants was 65%, of which 4% were viable. From the point of view of stimulation of growth processes, as our studies have shown, the most appropriate use of a DKW nutrient medium with the addition of 6-BAP at a concentration of 1.0 mg/l.

Further optimization of nutrient medium composition and growth regulators for clonal micropropagation of *C. avellana* can be aimed at increasing the content of biologically active substances in plant tissues.

Научный руководитель – Д.Н. Зонтиков, канд. с.-х. наук.

УДК 58.085

E. V. Maramokhin, K. V. Malakhova

Federal State Educational Institution «Kostroma State University»,
maramokhin91@mail.ru

PROSPECTS CALLUS TISSUE SCHISANDRA CHINENSIS (TURCZ.) BAILL. FOR BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

In practical biotechnology, attention is paid to the study of callus tissues for the further production of biologically active substances (BAS). Cell cultures of higher plants can serve as a source of secondary metabolites, but isolated examples of their commercial application are known. The main reasons for this situation are the low productivity of cell cultures by secondary metabolites and the high growth rate. Many plants from the family Schizandreaceae managed to achieve slow callus growth,

which makes it difficult to use for industrial purposes. The aim of the study was to improve the technique of obtaining callus tissue of Chinese magnolia vine (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.) Under in vitro conditions.

The object of the study is the callus tissue obtained from the uterine plants of *S. chinensis*. As the explant explants, runaway metamers, a leaf blade and an internode were used. The plant material was immersed in a 70 ° ethanol solution (30 seconds) followed by 3% sodium hypochlorite (15 minutes). After that, the material was washed in 3 and 4 flasks. For the production of callus tissues, the in vitro cultivation method was used on various types of nutrient media with the content of growth regulators. Callusogenesis in *S. chinensis* was induced from the leaf blade formed on the microscale, the interstice of the microscope, and also from the lower part of the mother cultivated shoot. More pronounced callusogenesis was observed in a part of *S. chinensis* tissues, which were passivated on the Quorin-Leporje nutrient medium (QL) with a meso-inositol content of 100 mg/l, glycine - 2 mg/l, thiamine - 0.5 mg/l, pyridoxine - 0.5 mg/l, sucrose - 20 mg/l, agar - 5.0 mg/l, as well as growth regulators of 6-BAP at a concentration of 1.0 mg/l and IMA at a concentration of 0.1 mg/l.

S. chinensis obtained three types of callus tissues from different parts of the plant, differing in color, friability, morphogenicity, and the presence of gemmogenesis kidneys.

Callus formation in *S. chinensis* is induced on hormonal and hormone-free media. On hormone-free media, it was characterized by slow growth and high tissue density, it was possible to get it from a part of the stem. Callus from the internode proved to be promising for the production of plant biomass and the use of this tissue for the production of BAS (Schisandrine). Subculturing time averaged 52 days.

An interstice has proved to be promising for obtaining the biomass of callus tissue in industrial biotechnology. The highest yield of dry biomass of callus of internodes was obtained on a QL medium with 6-BAP 1.0 mg/l and IMA 0.1 mg/l. The study of the peculiarities of cultivation of *S.*

chinensis in culture in vitro has shown wide possibilities for the introduction of clonal micropropagation methods for the purpose of obtaining callus for the subsequent isolation of BAS.

Научный руководитель – Д.Н. Зонтиков, канд. с.-х. наук.

УДК 579.66 (58.02/.04)

А.В. Тищенко, Л.В. Литвиненко

ФГБУН ПФИЦ Институт экологии и генетики микроорганизмов

УрО РАН, г. Пермь

arty.tishchenko@gmail.com

ВЛИЯНИЕ *RHODOCOCCLUS*-БИОСУРФАКТАНТОВ НА ФИТОТОКСИЧНОСТЬ ИОНОВ МЕДИ

Известно, что внесение биосурфактантов в почву, загрязненную тяжелыми металлами, способствует повышению их биодоступности и облегчает аккумуляцию металлов микробными клетками. При этом влияние сурфактантов биогенного происхождения на прорастание семян в среде, загрязненной металлами, практически не изучено. Установлено, что биосурфактанты способствуют ослаблению негативного воздействия тяжелых металлов на рост растений за счёт десорбции тяжелых металлов от компонентов почвы с последующим образованием с ними стабильных комплексов. Интенсивные исследования последних лет направлены на изучение свойств биосурфактантов гликолипидной природы, синтезируемых непатогенными алканотрофными актинобактериями рода *Rhodococcus*. Цель настоящего исследования – оценка влияния *Rhodococcus*-биосурфактантов на прорастание семян в присутствии ионов меди.

В сравнительных исследованиях изучено влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов (в концентрациях 2.0; 4.0 и 8.0 г/л воды) на фитотоксичность сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) в отношении

всхожести семян растений: овса посевного (*Avena sativa* L.), горчицы белой (*Sinapis alba* L.) и вики полевой (*Vicia sativa* L.). Уровень фитотоксичности определяли по методу МР 2.1.7.2297-07 «Фитотест». Эксперименты по фитотоксичности проводили на базе учебного ботанического сада Пермского государственного национального исследовательского университета. Сульфат меди добавляли в количестве, кратном 1, 10, 50, 100 и 200 ПДК. Неочищенные биосурфактантные комплексы, продуцируемые штаммом *R. ruber* ИЭГМ 231, получали методом, разработанным сотрудниками лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН. Бактериальную культуру выращивали в жидкой минеральной среде 'Rhodo', в качестве единственного источника углерода и энергии использовали *n*-додекан и *n*-гексадекан в концентрации 3 об.%.

В результате проведенных исследований установлено, что по степени устойчивости семян к ионам Cu^{2+} использованные в работе растения можно распределить в ряд: *Avena sativa* L. > *Sinapis alba* L. > *Vicia sativa* L. Выявлена прямая зависимость снижения фитотоксичности ионов меди под влиянием биосурфактантов, как при росте на *n*-додекане, так и на *n*-гексадекане. После предварительной обработки семян водной эмульсией *Rhodococcus*-биосурфактантов всхожесть семян возрастала в 1.5 – 4.5 раза; при этом наблюдалось десятикратное увеличение устойчивости использованных в экспериментах сельскохозяйственных растений к ионам меди, а также обнаруживался более интенсивный рост корней и побегов проростков растений-аккумуляторов тяжелых металлов в условиях загрязнения медью.

Исследования поддержаны Комплексной программой УрО РАН (проект 15-12-4-10).

Научный руководитель – И.Б. Ившина, д.б.н., проф., акад. РАН.

УДК 664.8:664.9

Я. Я. Тыньо, О. П. Бокарева

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина*

yytynio@mail.ru

ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ГУАРОВОЙ КАМЕДИ

Гуаровая камедь — это органический полимер и природный загуститель, применяемый в пищевой, нефтяной, текстильной и табачной промышленности, а также в производстве строительных смесей и косметических средств, взрывчатки. Качество продукта, в первую очередь, определяется первичным помолом и, соответственно, качеством механической очистки, в результате которой получают твердые частицы очищенной гуаровой камеди, перерабатываемые в порошкообразную форму.

На текущий момент гуаровая камедь — один из самых востребованных сырьевых продуктов в мире, спрос в России по данным 2014 года оценивается в 15 тыс. тонн, а за 2015 год — 19 тыс. тонн. Производство гуаровой камеди, выращивание *Cyamopsis tetragonolobus* (гуара) на территории Российской Федерации исследовано мало, в связи с чем актуальность данной тематики крайне высока.

Цель работы — разработка технологии получения высококачественной гуаровой камеди с более выгодной ценой и лучшими характеристиками, чем импортные аналоги. В связи с этим, было не обходимо адаптировать выращивание, переработку и хранение гуара под условия России.

В результате данной работы была разработана технология выращивания *Cyamopsis tetragonolobus* в степной зоне Крымского полуострова. Ранее в Российской Федерации *Cyamopsis tetragonolobus* в промышленных масштабах не выращивался. Был определен наиболее подходящий принцип хранения семян — в «полудолях», а также предложена технология подготовки семян *Cyamopsis tetragonolobus* к

хранению, что позволило увеличить срок сохранности сырья более чем в 2 раза и обеспечить повышение выхода конечного продукта при последующей переработке с 25% до 50%. Была подобрана оптимальная технология переработки гуара в гуаровую камедь с заданными физико-техническими параметрами.

Полученные результаты дают возможность наладить производство гуаровой камеди в России, обеспечить внутренний рынок, а также экспортировать данный продукт в другие страны.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

УДК 615.371

В. А. Устинова, Г. В. Морозова, Я. Я. Тыньо

*Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина*

yytynio@mail.ru

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРОТОТИПА ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

Основным преимуществом ДНК-иммунизации является введение в организм нуклеиновой кислоты, несущей информацию о белке, что гарантирует безопасность иммунизации. Несмотря на доказанную эффективность, ДНК-технология характеризуется замедленными и слабыми иммунными реакциями у крупных животных, что ограничивает ее широкое применение. Распространенным методом введения ДНК-вакцин стала внутримышечная инъекция, обеспечивающая доставку плазмиды к дендритным клеткам. Однако в последних исследованиях высокую эффективность показывает подкожная иммунизация за счет вовлечения в иммунологическую реакцию клеток Лангерганса — макрофагов кожи. Применение вместе с ДНК-вакцинами адьювантов повышает эффективность иммунизации за счет депонирования и стимуляции иммунореактивности.

Цель исследований — оценить безопасность экспериментальных прототипов ДНК-вакцины против бешенства. Использовали две

плазмиды, представляющие собой экспериментальные прототипы иммунобиологического препарата на основе модифицированного сигнальными последовательностями фрагмента генома, несущего информацию о гликопротеине G вируса бешенства, (экспериментальные прототипы ДНК-вакцины против бешенства), разработанные на основе технологии применения вектора.

Были изучены основные показатели безопасности препаратов: масса животных (низкая токсичность обуславливает отсутствие различий в массе опытных и контрольных групп, а также их органов); гематологические и биохимические (общий белок, альбумины и глобулины, альфа-амилаза, АСТ и АЛТ) показатели крови; патоморфологические изменения тканей и органов. Величину LD50 планировали рассчитать по результатам наблюдений через 24 ч, 7 и 14 суток после подкожного и внутримышечного введения препаратов, однако вычисление LD50 оказалось невозможным ввиду низкой токсичности экспериментальных прототипов. Интенсивный рост мышей, крыс и кроликов подтвердил безопасность испытуемых препаратов.

Испытание посчитали удовлетворительным, так как все животные остались живыми и клинически здоровыми в течение периода наблюдения; масса каждого животного в день окончания наблюдения не уменьшилась по сравнению с контролем. Ни у одного животного, получившего препарат подкожно, в месте введения не был обнаружен некроз или абсцесс. Гематологические и биохимические показатели крови оставались в пределах физиологической нормы на протяжении всего эксперимента. Внутренние органы были хорошего наполнения с эластичной консистенцией, без патоморфологических изменений; не было установлено статистически достоверной разницы в массе внутренних органов мышей контрольной и опытных групп.

Таким образом, впервые была оценена безопасность двух экспериментальных прототипов ДНК-вакцины против бешенства.

Научный руководитель – Я.Я. Тыньо, канд. биол. наук.

Школьная секция

УДК 61.613

О. И. Букреева

МБОУ «Центр образования № 38», г. Тула

bukreeva.olga.08@mail.ru

ЭКОЛОГИЯ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА: АНАЛИЗ СОСТАВА КОСМЕТИЧЕСКИХ КРЕМОВ

Для улучшения внешнего вида женщины часто используют различные косметические средства. В связи с этим на прилавках магазинов можно найти большой выбор косметики, отличающейся не только ценой, но и качеством, что напрямую зависит от компонентов данного изделия.

Последнее время, в СМИ (в частности, в телевизионных передачах, газетах и на радио) все чаще поднимается тема некачественной контрафактной парфюмерной продукции, способной нанести вред здоровью. К этой категории товаров относится гигиеническая косметика: косметические кремы, эмульсии, гели, масла для ухода за кожей лица, рук, тела, ног, лосьоны, различные шампуни и прочие средства для ухода за волосами, зубные пасты. В своей работе я рассматривала состав косметических кремов.

Целью нашего проекта было показать потребителям необходимость серьезнее подходить к выбору косметических средств, обращая внимание не только на цену изделия, но и на его состав и марку.

Мы предположили, что, несмотря на то, что косметика находится в свободном доступе на прилавках магазинов, и производители косметики утверждают, что она безопасна, это не всегда является правдой. Нами был исследован состав пяти различных косметических кремов (2 вида ВВ крема, 2 вида тонального крема и 1 вид увлажняющего крема для лица).

В ходе исследования удалось выявить самый безопасный и самый опасный из рассматриваемых кремов, а также обнаружить, что

практически во всех продуктах присутствуют силиконы и консерванты, что в случае чрезмерного использования данных средств может привести к высыпаниям на коже, а так же уничтожению естественной микрофлоры кожи. Также следует заметить, что использование рассмотренных кремов может привести к возникновению различных видов рака, аллергических реакций, контактного дерматита, а также вызывать гормональные сбои и угнетать ЦНС.

В данной работе нами подробно изучено болото площадью около 1 га, сформированное из серии карстовых провалов.

Ежегодно на протяжении 25 лет учащиеся нашей школы под руководством учителя биологии Максимовой Татьяны Владимировны посещают лес в районе поселка Озерный. Мы на практике знакомимся с флорой и фауной этого интересного места, наблюдаем различные этапы сукцессии карстовых провалов.

Во время экскурсий мы смогли найти 14 видов сосудистых растений, указанных в литературе как редкие виды, нуждающиеся в охране на территории Тульской области.

В результате экскурсий, проведенных весной и летом 2015-2016 года в районе поселка Озерный, нами было отмечено 104 вида высших сосудистых растений из 46 различных семейств. Флора исследуемого участка представлена 4 отделами: Папоротникообразные – 4 %, Хвощеобразные – 2 %, Плаунообразные – 1 %, Покрытосеменные – 93 %. Флора высших цветковых растений представлена 97 видами, из них 26 видов относится к классу однодольных (25 % от общего числа видов сосудистых растений) и 71 вид – к двудольным растениям (68 %).

Проанализировав количество видов в различных семействах, мы пришли к выводу, что значительная их часть – 21 семейство содержит по одному виду. Максимальное число видов – 10 имеет одно семейство – Осоковые, что связано с большим количеством переувлажненных местообитаний. Три вида имеет семейство Росянковые, что подтверждает уникальность данной территории. Небольшое число видов злаков и сложноцветных говорит скорее о недостаточной обследованности территории и необходимости провести больше выходов в летнее время. Большое число монотипических семейств

свидетельствует о высоком биологическом разнообразии обследованной местности.

Уникальное для нашей области болото, которое мы изучали на протяжении многих лет, не остается неизменным. Пока происходящие процессы носят естественный характер, так например, ближе к западному краю несколько лет назад вместе с деревьями провалилась сплавина, и появилось небольшое открытое водное пространство. Сейчас оно полностью закрылось и заросло осокой. Вызывает опасение тот факт, что существует постоянная опасность загрязнения этой уникальной природной территории, так как болото находится в 50 метрах от дороги.

Изучение видового разнообразия растений показало, что мы имеем дело с интересным природным объектом, заслуживающим дальнейшего изучения, охраны и присвоения ему статуса особо охраняемой природной территории.

Научный руководитель - Т. В. Максимова

УДК 58.009

В. Р. Малеванник

МБОУ «Центр образования №38», г. Тула

lera42001@mail.ru

**ИЗУЧЕНИЕ ФЛОРИСТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
ТЕРРИТОРИИ ВДОЛЬ Р. ОСЕТР В ОКРЕСТНОСТЯХ ДЕРЕВНИ
ДЕДИЛОВСКИЕ ВЫСЕЛКИ ВЕНЁВСКОГО РАЙОНА
ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ**

Венёвский район Тульской области дает прекрасные возможности для проведения полевых практик и углубленных занятий по биологии. Причина кроется в сочетании различных природных сообществ. Здесь хвойный и лиственный лес соседствуют с лугом, известняковые обрывы с оврагами и речкой. Данная работа помогает в осуществлении учебного процесса, а также может стать наглядным пособием для всех кто посетит берега прекрасной речки Осетр. Нами был составлен перечень растений,

произрастающих в бассейне реки Осетра, мы надеемся привлечь внимание людей к многообразию растительных сообществ Тульской области с целью сохранения видового разнообразия экологических систем.

На территории Венёвского района расположен массив, называемый Тульские засеки – наиболее хорошо сохранившийся участок восточно-европейских лесов. Особенностью этих лесов является то, что они систематически никогда не использовались под пашню, а вырубки всегда засаживались деревьями. Это позволило сохраниться здесь видам, исчезнувшим в других частях области. Примером могут служить заросли черемши, зубянок, разнообразные виды хохлаток. Сюда ежегодно выезжают учащиеся нашей школы для проведения полевой практики. Начиная с 2012 года каждое лето в течение недели, мною проводились наблюдения и исследования флористического разнообразия окружающей местности.

В фитоценозах долины Осетра преобладают монотипические и олиготипические семейства, что говорит о высоком разнообразии флоры. Наибольшее число видов, как и следовало ожидать, имеет семейство *Compositae* (48 видов), на втором месте *Rosaceae* (19 видов) и *Gramineae* (18 видов). Это связано с особенностями флористического состава центральной полосы России. *Fabaceae* (16 видов) и *Caryophyllaceae* (15 видов) занимают третью позицию. Фитоценозы на территории проведения полевой практики отличаются большим видовым разнообразием и стабильностью. Здесь нам удалось обнаружить и определить 282 вида сосудистых растений, что составляет 20% всех видов, указанных для Тульской области (1432 вида). В процессе исследования растительности Осетра было обнаружено несколько уникальных для Тульской области видов растений, таких как лен желтый, гроздовник полулунный, ленок слабительный. Берега Осетра оптимально подходят для изучения флоры Тульской области, так как здесь можно найти представителей различных сообществ, в том числе кальцефильную растительность благодаря выходам известняка.

Растительный мир исследуемого нами участка, идеально подходит для использования в учебных целях, но, как и большинство экосистем, он сильно подвержен антропогенному влиянию. Туристам, приезжающим отдохнуть, мы настоятельно советуем бережно относиться к редким растениям, соблюдать правила поведения в полевом лагере, не допускать загрязнения окружающей среды и уничтожения интересных растительных сообществ.

Научный руководитель – Т.В. Максимова.

УДК 544.01

А. Д. Молчанов

*Муниципальное бюджетное образовательное учреждение «Средняя школа №19», Тверь,
e-mail: ninochka025@mail.ru*

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОФЕ

В статье исследованы показатели качества, состава и свойств 4 образцов различных типов кофе (молотого, растворимого, молотого в растворимом и растворимого ванильного) с использованием стандартных методик из ГОСТ 32775-2014 и ГОСТ 32776-2014, а также спектрофотометрии и инфракрасной спектроскопии диффузионного отражения. Результаты исследований доказали значительные различия в составе и свойствах различных типов кофе.

Изначально были исследованы стандартные характеристики 4 образцов кофе – растворимого кофе «Jacobs Monarch»; молотого в растворимом «Jacobs Monarch Millicano»; молотого «Paulig» и растворимого ванильного «Moccona». Результаты исследований представлены в таблице.

Далее с целью сравнения свойств различных типов кофе были исследованы спектры образцов напитков оптическими методами физико-химического анализа. Анализ инфракрасных спектров образцов проводился с помощью инфракрасного спектрофотометра с

преобразованием Фурье и приставкой диффузионного отражения IRPrestige-21 («Shimadzu», Япония).

Показатель	Моло- тый	Моло- тый в раство- римом	Раство- римый	Раство- римый ваниль- ный
Массовая доля влаги, %	4,75	5,24	5,89	5,87
Массовая доля кофеина, %	1,13	2,84	2,95	2,51
Общее содержание золы, % масс.	4,35	5,67	4,98	4,87
Содержание золы, не растворимой в кислоте, % масс.	0,15	0,13	-	-
Содержание экстрактивных веществ, % масс.	34,3	32,4	-	-
Степень помола, % масс. менее 1 мм	96,34	-	-	-
Содержание металлических примесей, % масс.	Не обнаруже но	Не обнаруж ено	Не обнару жено	Не обнаруж ено
Продолжительность растворения, мин	-	-	Менее 0,5	Менее 0,5
рН напитка	5,68	5,13	5,37	5,24

Таким образом, исследованы показатели состава и свойств 4 образцов кофе различных типов. Результаты исследований доказали значительные различия в составе и свойствах различных типов кофе.

Научные руководители- Л.В.Михеева, учитель химии и биологии, Н.В. Дубинина, учитель математики и информатики.

ПРОЦЕССЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИНFUЗОРИЙ

Цель: изучение процессов жизнедеятельности инфузорий, обитающих в пресных водоемах.

Нами были отобраны пробы воды из природного водоема – пруд села Дорофеево (г. Тула, Тульская область), координаты пруда: 54°17'10.6"N 37°47'59.7"E.

В процессе работы нами было приготовлено и изучено более 100 препаратов из данного природного водоема.

С помощью светового микроскопа марки «Биомед-4» (тринокуляр) мы изучили приготовленные препараты, использовали устройство видеозахвата TourCam UCМOS 8 MP для фото- и видеосъемки, осуществили управление устройством видеозахвата с помощью программы TourView (версия 3.7), обработали фото- и видеоизображения с помощью программ KMPlayer (версия 2.9) и Windows Movie Maker (версия 2012). Для определения микроскопических организмов использовали научную литературу, в том числе определители, а также осуществляли поиск информации в Интернете.

В ходе исследования нами были найдены следующие представители типа Инфузории: инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum*), инфузория *Paramecium bursaria*, трубоч (Stentor sp.), сувойка (*Vorticella* sp.), стилонихия (вероятно, *Stylonichia mytilus*) и некоторые др. При определении инфузорий мы опирались на классификацию, предложенную в книге В. А. Догеля «Зоология беспозвоночных».

Нам удалось зафиксировать следующие процессы: движение, добывание пищи, ее переваривание и выведение непереваренных остатков, размножение – бесполое путем митотического деления клетки и половой процесс (конъюгация у инфузорий), выделение, осморегуляция, выход инфузорий из покоящихся стадий – цист, раздражимость.

Работа используется в учебном процессе – изучение микроскопических организмов позволило научиться вести наблюдения, работать с микроскопом, обрабатывать результаты, искать информацию в Интернете, пользоваться определителями.

Научный руководитель – Т. В. Максимова

Конференция проводится при финансовой поддержке:



ООО «Компания Хеликон»;

420111, г. Казань, ул. Университетская, 22, оф.107.

Тел. 8(843) 202-33-37; Моб. тел. +7-987-175-85-07

e-mail: a.ivanenko@helicon.ru



ООО «Диаэм»/Dia-M LLC;

тел. (495)745-0508, доб. 140

факс (495)745-0509,

Marina.Kuprikova@dia-m.ru

www.dia-m.ru



ООО «Мерк»/ LLC "Merck"

Valovaya Str. 35 | 115054 Moscow | Russia

Phone: +7 495 937 3304 (ext. 116) | Mobile: +7 915 356 22 04 |

E-mail:liudmila.zaeva@merckgroup.com

www.merckgroup.com

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Григорьев, 254
Коваль, 167
Челарская, 207
Шенфельд, 209
- A
- Abdelbaki, 297
Ахенов-Gribanov, 136
- B
- Badran, 133
Bedulina, 136
- G
- Gurkov, 136
- H
- Hassan, 65
Navrysh, 24
- I
- Ibrahim, 66
- K
- Karamova, 65
Kirillova, 297
Kiyamova, 24
Korsun, 68
- M
- Malakhova, 317, 318
Maramokhin, 317, 318
- P
- Potekhin, 68
Prokhorov, 297
- R
- Rands, 122
- S
- Savin, 133
Shvets, 297
Sigida, 66
- T
- Timofeyev, 136
- V
- Vereshchagina, 136
- Z
- Zdobnov, 122
- A
- Абдулхаков, 97
Агафонова, 102
Акатов, 34, 44
Аксенов-Грибанов, 112
Аксёнов-Грибанов, 71
Акутин, 214
Алексеева, 157
Ананьина, 73, 113
Анарбаев, 285
Андрианова, 17, 291
Анисимова, 145
Антипова, 19
Арнст, 10
Артемяева, 249
Астраханцева, 160
Атолагбе, 216
Ахметгалиева, 158
Ахметзянова, 21, 26
- Ахметов, 261
Аюпов, 4
- Б
- Бабаев, 302
Бабынин, 105
Багаева, 280, 299, 306
Бажутин, 69
Балалаева, 272
Балезина, 257
Балтин, 63, 247
Балтина, 235
Баркина, 278
Белоусова, 38, 153, 256
Беляев, 8
Бенкен, 95
Бикчентаева, 217
Бирюкова, 238
Блохина, 219
Бокарева, 322
Большакова, 22, 160
Бончук, 193
Борвинская, 153
Бриллиант, 221
Бугрова, 277, 282
Букин, 186
Букреева, 325
Букуру, 280
Булавинцева, 256
Булыгина, 115
Бурханова, 223, 267
Буторова, 134
Бычкова, 277
- B
- Важдаева, 22, 160

- Валеева, 162, 229
Валидов, 4, 105, 299
Ван Омберген, 245
Василенко, 160
Васильева, 277, 282
Васькова, 11
Веланский, 278
Велижанина, 163, 209
Видрашко, 300
Викторова², 289
Вирченко, 138
Войцеховская, 112
Войцеховская", 71
Вологин, 100, 127
Воронина, 73
Ворсина, 203
- Г
- Гаврилова, 117
Гавриш, 46, 53, 302
Гагарских, 75
Гайдуков, 257
Гайнуллин, 184
Гайсина, 77
Гайфуллина, 225
Галиева, 26
Галиева, 21
Галимуллина, 269
Галкин, 163, 209, 211
Гаранина, 165
Гареев, 79
Гарипова, 311
Гарипова¹, 127
Гатина, 165
Гелимуллина, 261
Георгиев, 193
Герасимова, 223, 267
Герасимова С.А., 271
Гладков, 19, 49
- ГЛЯВИНА, 28, 173
Гоголев, 90, 108, 119
Гоголева, 90
Голиков, 140
Голованов, 251
Голубицкая, 167
Горбунова, 81
Гордеева, 30
Гордлеева, 227, 254
Горохова", 272
Горшков, 90, 108, 109,
119, 196
Графодатский, 187
Григорьев, 227
Григорьева, 115
Гринёв, 84
Груntenко, 172
Губанова, 42
Гумерова, 212
Гурков, 153
Гурьев, 184
- Д
- Даминова, 90, 108, 119
Данилова, 168
Димова, 71
Дмитриева, 287
Долинская, 139, 144
Дружкова, 187
ДУДЕНКОВА, 28
Дурманова, 82
ДЯГТЕРЕВА, 28
- Е
- Евстигнеева, 84
Евстратова, 170, 175
Евстюхина, 157
Егорова, 86, 113, 162
Енюшин, 247
- Епифанова, 302
Еремина, 172
Ермин, 173
Есин, 32
Ефременко, 304
- Ж
- Жиленков, 274
Жукова, 235
Жученко, 173
- З
- Заичкина, 276
Зайцева, 229
Закирова, 26, 48
Залялютдинова, 306
Зацаринная, 125
Звягина, 34, 44
Зиганшин, 88
Зиганшина, 88
Злобин, 211
Зорина, 307
Зуева, 231
Зыкова, 309
- И
- И. Ш. Хусаинов, 4
Иванов, 51
Ильясов, 77
Ильясова, 140
Имбер, 142
Индейкина, 277, 282
- К
- Казанцев, 271
Карамова, 212, 213
Карнаухов, 139, 144
Карпов, 207
Карпова, 172

- Каткова, 145
 Каюмов, 110, 111, 119, 182, 184, 209
 Каюмова, 231
 Кирсанова, 34, 36
 Киямова, 46, 47, 53, 54
 Киясов, 10
 Климов, 79
 Кобякова, 36, 170, 175
 Коваль, 198
 Ковтунов, 90, 108
 Кожина, 157
 Козлов, 91, 93, 313, 314
 Козловская, 245
 Кокаева, 79
 Колобынина, 61
 Колпаков, 19
 Компанец, 284
 Коннова, 293
 Кононихин, 282
 Конышев, 233
 Королев, 79
 Королёва, 233
 Коротаев, 95
 Корсакова, 73
 Костенников, 48
 Костецкий, 278
 Кострюкова, 197
 КРАПИВНИЦКАЯ, 28
 Кремнев, 147
 Кузнецова, 10
 Кузьмина, 38
 Кулабухова, 311
 Кулемин, 197
 Кулигина, 42, 43
 Куприянов, 309
 Куприянова, 97
 Купряшина, 98
 Курбангалиева, 110, 117
 Курбатов, 184
 Кургина, 285
 Курилова, 313
 Кутыина, 49
 Куц, 207
- Л
- Лаврик, 285
 Лайков, 115, 117
 Ландышев, 120
 Ларин, 197
 Ласточкина, 311
 Латыпова, 149
 Лебедева, 155, 271
 Ленк-Сантни, 252
 Летова, 131
 Липачев, 10
 Лисевич, 177
 Литвиненко, 320
 Литвинова, 245
 Лобан, 235
 Логинов, 173
 Луговец, 40
 Лукина, 149
 Лукоянов, 227, 254
 Лутфуллин, 100, 127
 Лучникова, 315
 Львова, 261
 Любина, 102
 Лямина, 179, 203
- М
- Мавликеев, 10
 Мазина, 287
 Макаров, 138, 229
 Макарцова, 42
 Максименко, 193
 Максимова, 307
 Макунин, 187
 Маланин, 97
 Малеванник, 327
 Малова, 100
 Малыгина, 191
 Мальков, 276
 Маркелова, 131
 Мартынова, 21, 165
 Масгутова, 26, 43
 Маслова, 57
 Меглинский, 153
 Медведева, 191, 249
 Мельникова, 10
 Меньших, 44
 Мершина, 245
 Милицкова, 217
 Минайчев, 34, 36, 44
 Миндубаев, 105
 Минибаева, 287, 289
 Минигулова, 46, 53
 Минлебаев, 269
 Миннуллина, 106
 Минь, 291
 Мирзоев, 237
 Миронюк, 238
 Митаева, 239
 Митева, 241
 Мишеева, 106
 Мищенко, 271
 МОЖЕРОВ, 239
 Молчанов, 329
 Морозов, 197
 Морозова, 300, 323
 Мохаммед, 88
 Мохонов, 22, 160
 Мочалова, 100, 127
 Музыкантов, 191

Муллахметова, 43
Мухамедшина, 21, 48
Мухаметова, 243
Мухина, 49, 173, 239

Н

Насонова, 155
Насретдинов, 229, 252
Нассонова, 180
Немудрая, 42
Неустроева, 182
Никитин, 149
Никитина, 98
Носарева, 295
Носикова, 245
Носова¹, 247
Нуриахметова, 108

О

Огурцов, 21, 48
Онеле, 289
Осин, 10

П

Павельев, 10
Павлова, 110
Панькова, 249
Першин, 184
Пескова, 272
Петров, 231
Петрова, 90
Петунина, 186
Печенкова, 245
Пешехонов, 157
Пешкова, 291
Пигарева, 19, 49
Пимашкин, 19, 49
Плотникова, 73
Побединцева, 187

Поздина, 40
Позмогова, 51
Пономарева, 17, 98
Попова, 249
Порфирьев, 9, 134,
136
Приставка, 304
Пришнинская, 189
Пронина, 251
Протасов, 71, 112
Проттой, 191
Пряничников, 122
Пышная, 167
Пьянкова, 113

Р

Раваева, 238
Ржечицкий, 112
Ризванов, 22, 27, 43,
49, 61
Рихтер, 42, 167, 198
Розанова, 276
Романова, 81, 115
Рукавишников, 245
Румшиская, 245
Русановская, 144
Рыжикова, 117, 208
Рыжова, 163, 209
Рычкова, 252

С

Сабанеева, 95, 155
Сабиров, 138, 140,
145, 193
Сабирова, 63, 247
Савенкова, 46, 53
Савосенков, 227, 254
Салафутдинов, 43,
165, 166

Санина, 278
Сапожников, 102
Сафина, 97
Сахапов, 105
Семенов, 231
Семенова, 195, 197
Сенотов, 36, 44
Сергеева, 119
Сердюкова, 187
Серебрянский, 46, 53
Серяпина, 55
Сигида, 84
Синицын, 245
Синягина, 191
Ситдикова, 223, 267

Скворцов, 280
Скрипова, 46, 53
Скулкина, 200
Славуцкая, 259
Смирнова, 278
Соколова, 256
Солдатова, 274
Соловьева, 51, 61
Сопова, 163, 165, 209
Сорокина, 11, 276
Старикова, 120, 122
Стародумова, 57
Сташевски, 100, 127
Степовая, 295
Сульдина, 11
Суркина, 293
Сучков, 269
Сыромятникова, 26,
43
Сыромятникова,, 26

Т

Таранов, 211
Тарасевич, 331

Тарасова, 257
Тимофеев, 71, 112,
113, 137, 153, 154
Тихонова, 231
Тищенко, 320
Тойменцева, 123
Токинова, 134, 136
Томиловская, 245
Тошева, 106, 123
Трегубова, 120
Тризна, 117
Трофимцев, 151
Трошин, 274
Трунякова, 125
Тутукова, 302
Тухбатова, 306
Тыганов, 237
Тыньо, 82, 84, 86, 88,
142, 144, 151, 152,
168, 169, 247, 248,
251, 252, 300, 302,
322, 323, 324
Тюмина, 69

У

Уайтс, 245
Ульянова, 131, 158,
178
Усачев, 4
Устинова, 323

Ф

Фадеев, 170, 175

Фадеева, 34, 36, 44
Фахранурова, 6
Федоненко, 293
Федотова, 259
Федянин, 261
Филатова, 200
Фролова, 200, 205, 206

Х

Хабибулина, 202
Хадиева, 100, 127
Хаертдинов, 219, 233,
263
Хазипов, 229, 252
Хайруллин, 59
Хасаншина, 13
Хиляс,, 81
Хохлова, 179, 203
Хузахметова, 263
Хусаинов, 205, 265
Хьюго, 299

Ч

Чалабов, 15
Часов, 289
Черемных, 315
Черетаев, 265
Чернова, 117, 192,
208, 223, 267
Чинак, 167
Чулпанова, 61
Чуян, 238

Ш

Шадрин, 221
Шаравин, 129
Шарафутдинов, 110
Шарипзянова, 269
Шах Махмуд, 131
Шахристова, 295
Шенфельд, 163
Шестопалов, 51
Штырлин, 102
Шубина, 276
Шульман, 21, 48

Щ

Щапова, 153
Щенков, 147

Ю

Юрина, 211, 277, 282
Юсупов, 4

Я

Ягудина, 212
Яковлева, 81, 82, 155
Ямалитдинова, 63,
217, 247
Янакова, 252
Ярыгина, 79
Ястребова, 75
Яфарова, 243
Яхваров, 105, 106