

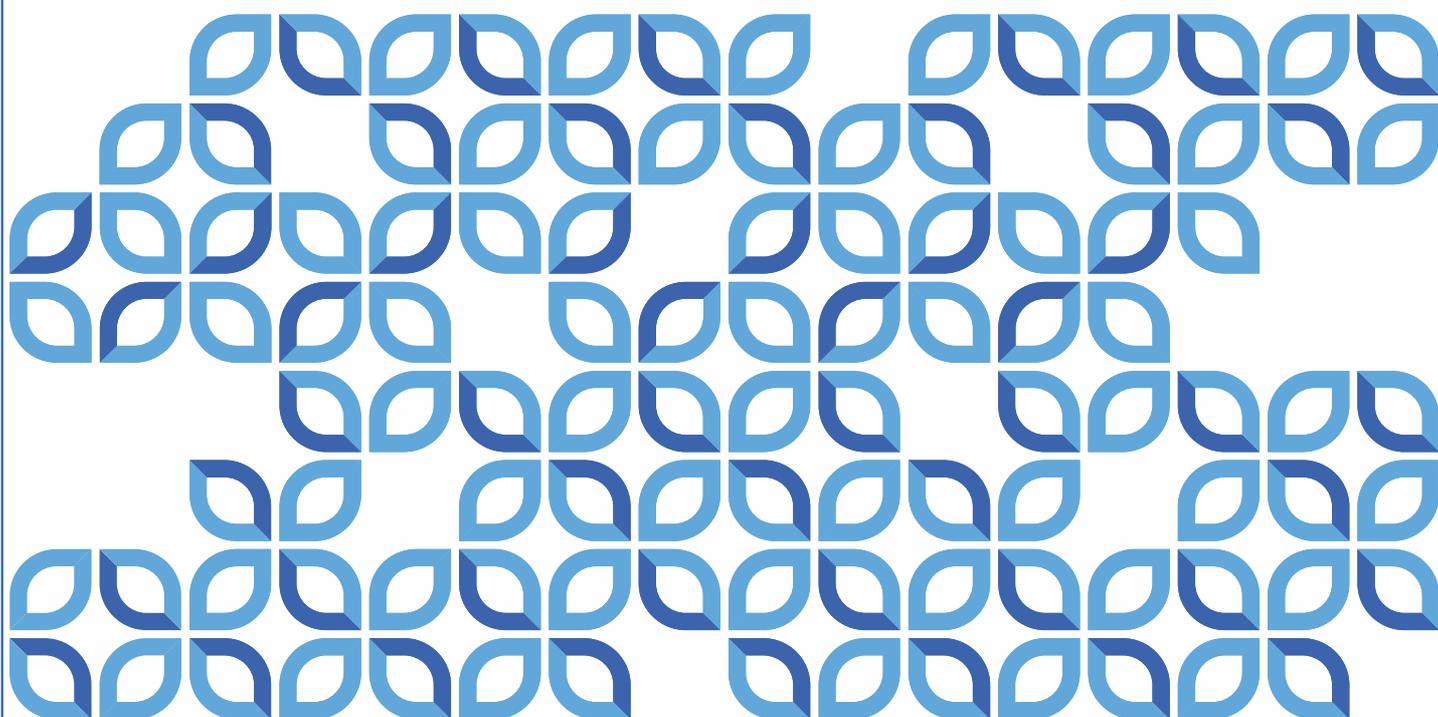


БИОЛОГИЯ
наука XXI века



школа-конференция
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

Сборник тезисов



Пушино, 9-13 апреля 2023 г.

Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук
Институт белка Российской академии наук

26-ая Пушкинская школа-конференция молодых
ученых с международным участием

«БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА»

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Пушино, 2023

УДК 576:577:579:578:574
ББК 28.07 + 28.4
С23

С23 Сборник тезисов 26-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».
Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – 358 с.

С 9 по 13 апреля 2023 года в г. Пушино проходила 26-я Пушкинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». На конференции были рассмотрены новейшие достижения и результаты исследований молодых ученых, специализирующихся в различных областях биологической науки. Были проведены мастер-классы и пленарные лекции ведущих ученых. В сборнике представлены тезисы 336 докладов участников конференции по следующим направлениям:

- молекулярная биология и биоинформатика;
- клеточные технологии;
- микробиология и вирусология;
- физиология животных и биомедицина;
- физиология и биохимия фотосинтезирующих организмов;
- экология и почвоведение.

Публикуется в авторской редакции

УДК 576:577:579:578:574
ББК 28.07 + 28.4

© Коллектив авторов
© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА	4
КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ	75
МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ	128
ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОМЕДИЦИНА	204
ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ	274
ЭКОЛОГИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ	310
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	346

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА

ХАРАКТЕРИСТИКА СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FUR С РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТЬЮ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК *PRRF PSEUDOMONAS PUTIDA BS3701*

Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

tanechka2576@yandex.ru

Железо является одним из важных металлов для живых организмов. На сегодняшний день известны два участника процесса регуляции его гомеостаза в бактериальных клетках: транскрипционный репрессор Fur и Fur-зависимые некодирующие РНК (нкРНК) *prgF*. *PrgF* хорошо изучены у *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: они располагаются тандемно, а идентичность – 90%. Однако и у других видов *Pseudomonas* присутствуют гены *prrf*: они располагаются отдельно друг от друга, а идентичность не менее 80%. В геноме *P. putida* BS3701 найдены две нкРНК *prrf*, расположенные в разных локусах, чья идентичность составляет 94%. Мы предполагаем, что наличие двух практически одинаковых *prrf* может быть обусловлено разной транскрипционной регуляцией этих генов, которая позволяет бактерии поэтапно приспосабливаться к изменяющейся концентрации железа. Поэтому задачей работы было охарактеризовать комплексы белка Fur с регуляторными областями нкРНК *prrf P. putida* BS370.

Для проведения эксперимента по образованию комплексов «регуляторная область нкРНК-Fur» был очищен рекомбинантный Fur с последовательностью из 6 гистидинов на N-конце. Промотор и сайт связывания транскрипционного репрессора Fur, составляющие регуляторную область нкРНК, были предсказаны биоинформатически. Фрагмент ДНК с регуляторной областью, был амплифицирован с использованием праймеров, содержащих карбоксифлуоресцеин на 5'-конце. Реакцию связывания проводили в буфере состава (3,3 мМ Трис-ацетат pH 7,5, 1 мМ Mg(CH₃COO)₂, 6,6 мМ K(CH₃COO)₂, 0,01 мг/мл БСА, 100 мкМ MnCl₂) в присутствии 100х избытка ДНК тимуса теленка при температуре 28°C в течение 30 минут. По результатам эксперимента мы можем сказать, что регуляторные области обеих нкРНК образуют только один комплекс с белком Fur. Это расходится с некоторыми литературными источниками, где было показано образование нескольких. Константа диссоциации комплекса «регуляторная область нкРНК-Fur» для одной *prgF* в 3 раза выше, чем для другой. Возможно, регуляция транскрипции этих генов в клетках *P. putida* BS370 действительно отличается.

СРАВНЕНИЕ ХАРАКТЕРА РАБОТЫ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА НА ОСНОВЕ МУТАНТНОГО РОДОПСИНА И БЕЛКА ДИКОГО ТИПА

**Алехин В.А., Бухалович С.М., Багаева Д.Ф., Михайлов А.Э.,
Власова А.Д., Ильинский Н.С.**

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия
alekhin.va@phystech.edu

Управление рН лизосом – перспективный способ поддержания гомеостаза клетки. lyso-Rhodopsin представляет собой химерный белок, подобный оптогенетическому инструменту lyso-pHoenix, в котором прямая протонная помпа Arch3 заменена на обратную – XenoRhodopsin, при воздействии света выкачивающую ионы водорода из лизосом и повышающую их рН. XenoRhodopsin считается перспективным белком для использования в оптогенетике.

В настоящей работе проведено сравнение эффектов химерных белков lyso-Rhodopsin с XenoRhodopsin дикого типа и с точечной мутацией по 220-ому положению (D220N), важному для функционирования родопсина (соответствующая аминокислота является промежуточным акцептором протонов). Изменения рН люмена лизосом фиксировались за счёт рН-чувствительного флуоресцентного белка pHluorin, входящего в состав lyso-Rhodopsin в качестве домена. Наблюдения проводились на оборудовании для конфокальной микроскопии от компании ZEISS.

В результате работы было выяснено, что lyso-Rhodopsin, экспрессированный с мутантной кодирующей последовательности, как и содержащий родопсин дикого типа, при воздействии света защелачивает люмен лизосом, но делает это с меньшей эффективностью (соответствующая разница является статистически значимой, p -value=0,01). Кроме того, было показано, что у мутантного родопсина и белка дикого типа отличается процесс восстановления лизосомального рН после защелачивания: в случае XenoRhodopsin дикого типа выделяется быстрая стадия обратного закисления, которая сменяется медленной; в случае мутанта быстрая стадия отсутствует, и закисление происходит постепенно.

Таким образом, настоящая работа демонстрирует разницу в характере работы белка XenoRhodopsin дикого типа и мутантного. В дальнейшем будет проведено сравнение эффективности работы данных средств (по уровню изменения рН лизосом и цитозоля) в клетках в разном состоянии (при разных уровнях АТФ и т. п.).

Авторы выражают благодарность поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-03-2023-106, проект FSMG-2020-0003) в части работ по флуоресцентной микроскопии. Работы по экспрессии родопсинов в клетках млекопитающих выполнены за счёт гранта РФФИ № 21-64-00018.

РОЛЬ ГЕНОВ АНТОЦИАНИДИН-3-О-ГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ (*UFGT*) В БИОСИНТЕЗЕ АНТОЦИАНОВ У ПЕРЦА (*CAPSICUM ANNUUM*)

Анисимова О.К., Филюшин М.А.

ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

lelikanis@yandex.ru

Окраска плодов растений в красно-сине-фиолетовой гамме обусловлена синтезом и накоплением антоцианов в вакуолях клеток. Помимо аттрактивной функции, антоцианы являются антиоксидантами и участвуют в ответных реакциях на абиотические и биотические стрессы.

Антоцианы относятся к водорастворимым флавоноидам и представляют собой соединение антоцианидина с молекулой сахара и ацильной группой. У растений путь биосинтеза антоцианов высоко консервативен. Девять ферментативных реакций приводят к образованию из фенилаланина антоцианидинов (пеларгонидин, цианидин и дельфинидин), к которым затем присоединяются молекулы сахара для получения стабильных и водорастворимых пигментов. Перенос глюкозильной части UDP-глюкозы на 3-гидроксильную группу антоцианидинов катализируется антоцианидин-3-О-глюкозилтрансферазой (*UFGT* (UDP-глюкозо-флавоноид-глюкозилтрансфераза)). Целью данной работы была характеристика генов *UFGT* перца *Capsicum annuum* и определение их роли в биосинтезе антоцианов.

В геноме перца *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1B) было идентифицировано два гена антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз – *UFGT1* (LOC107843659) и *UFGT2* (LOC107843660). Последовательности генов *UFGT1* и *UFGT2* не содержали интронов и имели сходные характеристики. Оба кодируемых фермента антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз включали консервативный UDP-гликозилтрансферазный домен GT1_Gtf-like (cd03784).

У сортов перца видов *C. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и *C. frutescens* (Самоцвет) в листьях и кожице плода (по мере созревания) было определено содержание суммы антоцианов и профили экспрессии генов *UFGT1* и *UFGT2*. Содержание антоцианов у сортов Сиреневый куб и Отелло максимально в кожице незрелого плода (стадия 1) и по мере созревания плода снижается. У сорта Самоцвет содержание антоцианов высокое на стадиях 1 и 2 и значительно падает к стадии 3. У сорта Сибиряк антоцианы в кожице плодов не обнаружены. В листьях наибольшее содержание суммы антоцианов было детектировано у сорта Самоцвет (~1100 мкг/г; фиолетовая окраска), тогда как у сортов Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк оно было значительно ниже (~2-12 мкг/г; зеленая окраска).

Показано, что транскрипты генов *UFGT1* и *UFGT2* присутствуют в листьях всех исследуемых сортов. В кожице плода транскрипты *UFGT1* детектированы на стадиях созревания 1 (Сиреневый куб и Отелло) и 1–3 (Самоцвет), тогда как транскрипты *UFGT2* – во всех образцах с наибольшим значением у сорта Сибиряк, где антоцианы отсутствовали.

Сопоставление биохимических и экспрессионных данных выявило положительную корреляцию количества антоцианов в кожице плодов и в листьях с уровнем транскриптов гена *UFGT1*. Для гена *UFGT2* корреляции не выявлено. Таким образом, можно предположить, что в растениях перца уровень синтеза антоцианов и в листьях, и в плоде находится в прямой зависимости от активности *UFGT1*.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-16-00016.

КОНСЕРВАТИВНЫЙ TRP ЭНДОЛИЗИНОВ ФАГОВ RB49 И T5:
ВЛИЯНИЕ НА СТРУКТУРУ И КАТАЛИЗ

Аракелян А.Г.^{1,2}, Чернышов С.В.¹, Прохоров Д.А.², Микулинская Г.В.¹

¹Филиал Института биоорганической химии РАН, Пушино, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино,
Россия

arkatsachndir@gmail.com

Эндолизины бактериофагов RB49 (Myoviridae) и T5 (Siphoviridae) (EndoT5 и EndoRB49) – ортологичные ферменты, гидролизующие пептидогликан клеточной стенки бактерий. Они принадлежат к семейству цинксодержащих пептидаз M15_C и являются однодоменными глобулярными белками. Кроме каталитического Zn^{2+} , EndoT5 связывает регуляторный Ca^{2+} .

Вблизи активного центра этих ферментов был обнаружен строго консервативный остаток триптофана, не входящий в регулярные структуры и экспонированный в раствор. Для анализа его роли в катализе с помощью сайт-направленного мутагенеза были получены мутанты, содержащие точечные замены: EndoT5W114A, EndoT5W114F, EndoRB49W109A, EndoRB49W109F. Замены триптофана на функционально близкий фенилаланин как в EndoT5, так и в EndoRB49 сохраняли одну треть от активности природных белков. Однако аланиновый мутант EndoT5W114A был полностью лишен активности, при этом EndoRB49W109A сохранил остаточную активность на уровне 5% от активности природного белка.

Анализ одномерных ¹H ЯМР спектров EndoRB49(Zn^{2+}) и EndoT5($Zn^{2+}Ca^{2+}$) форм мутантов показал, что по мере сокращения объема остатка W→F→A уменьшается плотность упаковки гидрофобного ядра глобулы. В случае серии мутантов EndoRB49 постепенное смещение положения сигнала H117 в высокопольную область отражает изменение взаимной конфигурации остатков гистидинов активного центра H117 и H62, координирующих цинк, и коррелирует с удельной активностью. Аналогичные изменения характерны и для $Zn^{2+}Ca^{2+}$ форм мутантов EndoT5: смещение сигнала H133 в высокие поля также коррелирует с убыванием объема замещающего остатка и активностью. Интересно, что у мутантов EndoT5 падает сродство к регуляторному кальцию (W>F>A): маркером этого является уменьшение интенсивности высокопольного сигнала γ H He82, возникающего в нативном белке после индуцированной Ca^{2+} фиксации регуляторной петли на глобулярном домене.

Таким образом, консервативный остаток Trp114/109, хоть и экспонированный в раствор, ввиду пространственных ограничений своей боковой цепи существенно влияет на формирование каталитически активной формы фермента и критически важен для катализа ортологичными эндолизидами неродственных бактериофагов RB49 и T5.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-24-00210.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГИАЛУРОНИДАЗЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОСМЕТОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

**Арзуманова А.Р., Рябова А.С., Лепехина О.В., Бунеева Е.А., Попович С.А.,
Толкачева А.А., Корнеева О.С., Черенков Д.А.**

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

alinich0sh@gmail.com

К гиалуронидазам относят муколитические ферменты, расщепляющие основную составляющую соединительных тканей (гиалуроновая кислота и хондроитин) различного происхождения. Данный фермент встречается в тканях и органах млекопитающих и рыб, а также играет ведущую роль в развитии инфекционных процессов для некоторых патогенных бактерий. Область применения гиалуронидазы обширна, ее препараты активно внедряются в офтальмологии, хирургии, дерматохирургии, трансплантологии и многих других областях медицины. Несколько десятилетий лекарственные формы на основе данного фермента активно используются в лечении воспалительных и спаечных процессов в органах малого таза, используются совместно с антибиотическими препаратами, что значительно увеличивает их биодоступность. Способность гиалуронидазы повышать эластичность соединительной ткани и проницаемость межклеточного пространства применяется при лечении рубцов и различных косметических дефектов кожного покрова, в частности гранулематозных реакций, а также применяется для выведения филлеров на основе гиалуроновой кислоты. В настоящее время существует необходимость в получении новых препаратов гиалуронидазы, так как большое клиническое значение имеет применение именно высокоочищенных форм фермента, которые проблематично получить из животного сырья. Исследования также показывают, что человеческая кровь содержит в себе термолабильный ингибитор бычьей гиалуронидазы. Такие препараты также не отличаются высокой активностью и стабильностью в растворах. Получение гиалуронидазы из животного сырья в промышленных масштабах затруднено, поскольку требует больших временных и производственных затрат, при этом выход готового продукта относительно основного сырья составляет менее 1% при невысокой удельной активности препарата. В качестве альтернативного источника гиалуронидазы могут выступать микроорганизмы, бактериальные гиалуронидазы отличаются высокой специфичностью к субстрату и большей стабильностью, поэтому целью нашего исследования является получение новой формы рекомбинантной гиалуронидазы с высокой производительностью и эффективностью в клиническом применении.

Нами проведен сравнительный анализ генов природных продуцентов гиалуронидаз с использованием баз данных биотехнологической информации и в качестве источника гена для создания рекомбинантного продуцента гиалуронидазы выбраны бактерии *Streptomyces griseus*, так как субстратом для гиалуронидаз этих бактерий является исключительно гиалуроновая кислота, а конечными продуктами реакции являются тетра- и гексасахариды с N-ацетилглюкозамином на редуцирующем конце молекулы. На основании проведенных исследований разработана генетическая конструкция для экспрессии гиалуронидазы в *Escherichia coli* с использованием плазмидного вектора pET23b+ (Novagen). Дальнейшая экспрессия рекомбинантной гиалуронидазы и определение её физико-химических свойств послужит основой для разработки технологии получения новых медицинских и косметологических препаратов.

АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ 5'-UTR ГЕНА ЛИКОПИН- ϵ -ЦИКЛАЗЫ *LcyE* И ИХ ЭКСПРЕССИЯ У ОБРАЗЦОВ КУКУРУЗЫ

Архестова Д.Х.^{1,2}, Анисимова О.К.¹

¹Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии
РАН, Москва, Россия

²Институт сельского хозяйства – филиала Кабардино-Балкарского научного центра РАН,
Нальчик, Россия

lelikanis@yandex.ru

Зерна кукурузы *Zea mays* L. могут иметь разную окраску в зависимости от состава и содержания каротиноидов. В последовательности 5'-UTR гена ликопин- ϵ -циклазы *LcyE* – одного из ключевых генов биосинтеза каротиноидов у кукурузы, описаны полиморфизмы, связанные с пониженной экспрессией гена и, соответственно, повышенным содержанием провитамина А (β -каротин, β -криптоксантин и α -каротин). Доноры мутантных аллелей *LcyE* активно используются в селекции линий кукурузы с обогащенным провитамином А зерном.

В данной работе был проведен анализ аллельных вариантов 5'-UTR гена *LcyE*, потенциально эффективных для повышения биосинтеза β -каротина, у 20 инбредных линий кукурузы отечественной селекции, различающихся окраской зерна. Проведенные амплификация и секвенирование участка 5'-UTR гена *LcyE*, позволило выявить помимо ранее описанного аллеля А2 (248 пн), соответствующего низкому содержанию β -каротина в зерне (у 4 линий), нового аллеля – А5 (235 пн) у 16 линий. Аллель А5 характеризовался четырьмя мононуклеотидными полиморфизмами и двумя делециями (7 и 8 пн). Проведенное сравнение цис-регуляторных элементов в анализируемой области 5'-UTR анализируемых аллелей А2 и А5 обнаружило различие в сайтах связывания с транскрипционными факторами (ТФ). Так, у аллеля А5 отсутствует сайт связывания с bZIP ТФ (А-box) и присутствует сайт связывания с МУС ТФ (САТТТГ). Оба семейства ТФ вовлечены в ответ растений на стресс.

Для А5-линий было показано, что содержание β -каротина в листе значительно выше, чем у А2-линий. Была определена экспрессия гена *LcyE* в листьях двух линий с аллелем А2 и трех с аллелем А5. Данные анализа показали зависимость между присутствием аллеля А5 и снижением экспрессии гена. При этом уровень транскрипции гена в случае аллеля А5 был в 10–15 раз ниже, чем в случае аллеля А2.

Известно, что снижение экспрессии *LcyE* приводит к смещению биосинтеза каротиноидов в сторону ветви β - β с усиленным образованием β -каротина и β -криптоксантина (наиболее эффективных предшественников витамина А), что, в числе прочего, обуславливает более интенсивную (темно-желтую, оранжевую) окраску зерна. Полученные данные позволили предположить, что наличие в геноме кукурузы нового описанного аллеля А5 5'-UTR гена *LcyE* может коррелировать со снижением или подавлением экспрессии данного гена и количеством β -каротина и его производных в листе, а также, при стабильной активности других ферментов каротиногенеза, с окраской зерна.

Использование доноров аллеля А5 в комбинации с известной темно-желтой или оранжевой окраской зерна может быть использовано в селекции кукурузы с повышенным синтезом провитамина А в зерне.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 21-16-00008.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА RUNX2 МЕТОДОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Басович Л.С.¹, Малашичева А.Б.²

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

L.Basovich@yandex.com

Кальцификация сосудов и клапанов сердца представляет собой отложение кристаллов гидроксиапатита в ткани и является жизнеугрожающим состоянием. Изучение механизмов кальцификации важно с точки зрения понимания патогенеза кальцификации и поиска соответствующей терапии. Одним из этапов кальцификации сосудов является эндотелиально-мезенхимный переход, при котором эндотелиальные клетки теряют свои генетические маркеры, такие как VE-кадгерин (CDH5, CD144) и CD31 (PECAM-1), и начинают приобретать фенотип мезенхимных клеток посредством экспрессии α -гладкомышечного актина, фибробласт-специфического белка 1 (FSP-1) и фибронектина.

Транскрипционный фактор Runx2 (CBF- α -1) является ключевым регулятором и маркером остеогенной дифференцировки. Данный белок играет регуляторную роль в клеточной пролиферации в фибробластах и остеобластах, однако его роль в регулировании функций эндотелиальных клеток остается неясной.

Целью исследования являлась оценка влияния нокдауна транскрипционного фактора Runx2 на эндотелиальные свойства клеток. Ингибирование экспрессии гена *RUNX2* осуществляли методом РНК-интерференции путем введения в эндотелиальные клетки пуповинной вены человека (HUVES) короткой шпилечной РНК, shRunx2, на лентивирусном носителе. Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени через 72 часа после трансдукции.

Уровни экспрессии генов *CD31*, *CDH5*, *vWF*, характерных для эндотелиальных клеток, а также уровни генов *NOTCH1* и *NOTCH4* при трансдукции клеток пупочной вены человека HUVES лентивирусными частицами, кодирующими shRunx2, возрастали более чем в 2 раза по сравнению с контрольными клетками, что указывает на усиление эндотелиальных свойств клеток при блокировании экспрессии *RUNX2*. Таким образом, подавление экспрессии *RUNX2* в эндотелиальных клетках вызывало усиление экспрессии эндотелиальных маркеров в клетках HUVES. Необходимы дальнейшие исследования влияния гена *RUNX2* на функциональные свойства эндотелиальных клеток.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

ПРЕДСКАЗАНИЕ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ микроРНК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ АСТМЫ

Бекенкали А.Б., Еркинкажина Е.Е., Касымова Ж.Е., Төлеуқанова Т.Т.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

bekenkaliaa@gmail.com

Астма является наиболее распространенным воспалительным заболеванием дыхательных путей, которым страдает более 10% населения планеты. Она характеризуется бронхоконстрикцией, гиперреактивностью дыхательных путей, вазодилатацией, отеком дыхательных путей и раздражением чувствительных нервов, с повторяющимися симптомами одышки, хрипов, стеснения в груди и кашля. Это одна из основных причин заболеваемости во всем мире, которая возникает в результате ослабления иммунной системы в ответ на аллергены и воздействие окружающей среды. В настоящее время во всем мире бронхиальной астмой страдают около 300 миллионов человек и по оценкам к 2025 году она затронет еще 100 миллионов человек.

Целью исследовательской работы было выявление генов-мишеней микроРНК, которые могут быть биомаркерами для диагностики астмы и имеют важное значение в ее возникновении и развитии.

В результате этой работы была создана база данных генов и микроРНК, участвующих в развитии астмы. Поиск генов проводился в базе данных DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>). В ходе поиска база данных выдала несколько сотен генов-кандидатов, все из которых были протестированы отдельно. Была выявлена ассоциация гена с соответствующими заболеваниями, и была создана база данных генов, участвующих в развитии этого заболевания. В ходе исследования было идентифицировано 25 генов, участвующих в развитии астмы, и эти гены являются мишенями для нескольких микроРНК. База данных miRDB (<http://www.mirdb.org/mirdb/index.html>) была использована для предсказания генов-мишеней микроРНК. Оценка целевого прогноза для прогнозируемой цели составляет от 50 до 100. Чем выше оценка, тем более достоверным является этот прогноз. Согласно полученным результатам, ген *MPL* был идентифицирован, как ген который имеет предрасположенность в развитии астмы и является геном-мишенью для 94 микроРНК, таких как *miR-4447*, *miR-5683*, *miR-6785-5p* и др. Целевой показатель между этим геном и микроРНК варьировался от 50 до 93. Самый высокий балл был характерен для ассоциации между *hsa-miR-4664-5p* и геном *MPL*. Кроме того, ген *BCL2* является мишенью для 214 микроРНК. Целевой показатель ассоциации между этим геном и микроРНК варьировался от 50 до 100. Самый высокий балл был получен за связь между геном *BCL2* и *hsa-miR-6867-5p*. Ген *IKZF3* является геном-мишенью для 336 микроРНК. Оценка взаимосвязи между этим геном и микроРНК варьировалась от 50 до 99, и самый высокий балл был характерен для взаимосвязи между геном *IKZF3* и *hsa-miR-3158-5p*.

В заключение следует отметить, что на основании установленных взаимосвязей между генами и микроРНК, выявленных в ходе исследовательской работы, можно определить ход возникновения и развития астмы и предложить методы их диагностики.

ДЛИНА ПОЛИ(А)-ХВОСТА мРНК МОДУЛИРУЕТ
АКТИВНОСТЬ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА
ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eRF1-eRF3

Бизяев Н.С.¹, Шувалов А.В.^{1,2}, Алкалаева Е.З.^{1,2}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Москва, Россия

bizyaev@imb.ru

Поли(А)-хвост является консервативной и функционально важной структурой практически всех эукариотических мРНК. Её длина динамически изменяется в популяции клеточных мРНК. Показана связь длины поли(А)-хвоста и активности трансляции, а также стабильности молекулы мРНК. В последнее время появляются свидетельства, что удаленность стоп-кодона от поли(А)-хвоста играет критическую роль как в эффективности терминации трансляции, так и нонсенс-опосредованного распада на таком стоп-кодоне. Основным белком, обуславливающим эффект поли(А)-хвоста, является цитоплазматический поли(А)-связывающий белок 1 типа (РАВРС1). РАВРС1 взаимодействует как с поли(А)-хвостом мРНК, так и с рядом факторов трансляции, комплексов деаденилирования и других клеточных комплексов. В ряде исследований, в том числе и в нашей лаборатории, было показано, что РАВРС1 стимулирует эффективность терминации трансляции за счет взаимодействия с комплексом факторов терминации трансляции eRF1-eRF3. Однако до сих пор у эукариот влияние длины поли(А)-хвоста и, соответственно, количества связанного с мРНК молекул РАВРС1 на процесс терминации трансляции показано не было.

Для изучения механизмов такого влияния с помощью метода Termi-Luc (*Susorov et al.*, 2020) мы получили очищенные претерминационные рибосомные комплексы (преТК), остановленные на стоп-кодоне и кодирующие нанолуциферазу. мРНК, входящая в состав таких преТК, имела разную длину поли(А)-хвоста от 0 до 100 нт. Синтезированная нанолуцифераза не способна люминесцировать в связанном с преТК состоянии, однако при освобождении в раствор она приобретает эту способность. Благодаря этому можно в режиме реального времени наблюдать эффективность протекания процесса терминации трансляции. Также с помощью Вестерн-блоттинга мы валидировали положительную корреляцию количества РАВРС1 на одну молекулу собранных преТК с длиной её поли(А)-хвоста.

Мы обнаружили, что увеличение длины поли(А)-хвоста повышает каталитическую эффективность комплекса eRF1-eRF3 в терминации трансляции. При этом, каталитическая эффективность комплекса факторов, в составе которого находится укороченный eRF3с (не способный связываться с РАВРС1), от длины поли(А)-хвоста не зависела. Это согласуется с эффективностью трансляции экзогенных некэпированных мРНК с различной длиной поли(А)-хвоста в лизате НЕК293F, которая также возрастает с увеличением длины поли(А)-хвоста. Однако, для трансляции кэпированных мРНК наблюдается более сложная колоколообразная зависимость с максимумом в районе длины поли(А)-хвоста в 75 нт.

Полученные данные согласуются с наблюдаемой важностью цис-взаимодействия факторов, связанных с разными районами мРНК, вследствие их пространственного сближения при формировании closed-loop структур молекулы мРНК. В частности, работа доказывает

необходимость сближения поли(А)-хвоста и стоп-кодона для эффективного протекания терминации трансляции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00382.

Susorov D., Egri S., Korostev A. A. Termi-Luc: a versatile assay to monitor full-protein release from ribosomes //RNA. – 2020. – Т. 26. – №. 12. – С. 2044-2050.

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА КЛЕТОК В ОТВЕТ НА ОБРАБОТКУ СТРУЕЙ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ

**Бирюков М.М.^{1,2,3}, Патракова Е.А.¹, Милахина Е.В.^{3,4}, Закревский Д.Э.^{3,4},
Швейгерт И.В.³, Коваль О.А.^{1,2,3}**

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН,
Новосибирск, Россия

⁴Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

biryukov.mm@ya.ru

Холодная плазма представляет собой газ, частично ионизированный под действием электромагнитного поля. В последние годы активно разрабатываются подходы для использования холодной плазмы в терапии онкологических заболеваний. Так, показана индукция различных форм гибели клеток вследствие обработки холодной плазмой, включая апоптоз, пироптоз, ферроптоз, некроптоз и иммуногенную гибель клеток. Однако до сих пор не удается построить картину передачи сигналов в этих процессах на молекулярном уровне для дальнейшего применения холодной плазмы в доклинических и клинических исследованиях. Транскриптомный анализ может позволить выявить ключевые гены, активация/подавление экспрессии которых отвечает за разнообразные биологические эффекты холодной плазмы.

Целью работы было изучение изменений в транскриптоме клеток аденокарциномы легкого человека A549 в ответ на обработку струей холодной плазмы.

В работе использовали газоразрядную установку, разработанную в Институте физики полупроводников СО РАН. Клетки культуры A549 обрабатывали холодной плазмой, через 3 и 24 часа проводили лизис клеток с помощью реагента «Лири» (ООО «Биолабмикс», Россия), выделяли суммарную РНК. Подготовка библиотек кДНК и секвенирование проводились на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань).

Качество прочтений оценивали с помощью программы FastQC v0.11.9, фильтрацию ридов проводили с помощью fastp v0.22.0. Картирование ридов на транскриптом человека (сборка GRCh38) проводили с помощью kallisto v0.44.0. Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) идентифицировали, используя DESeq2 v1.38.2. Образцы

обработанных клеток сравнивали с контрольными образцами необработанных клеток. Дифференциально экспрессирующимися считали гены с $|\log FC| \geq 1,0$.

В ходе анализа данных секвенирования было идентифицировано 116 ДЭГ в образцах РНК клеток через 3 ч после обработки холодной плазмой и 533 ДЭГ через 24 ч. Функциональную аннотацию ДЭГ проводили с помощью пакета EnrichR v3.1 и баз данных Gene Ontology, Reactome 2022, KEGG 2021 Human и ENCODE and ChEA Consensus TFs. Методом ОТ-ПЦР PB проводили валидацию данных секвенирования по продуктам генов FOS, FOSB, KLF4, ATF3, GADD45B.

Проведенный анализ показал активацию сигнальных путей, связанных с ответом на окислительный стресс, а также на стресс эндоплазматического ретикулума для образцов через 3 ч после обработки. Через 24 ч наблюдается активация путей, регулирующих клеточный цикл, что приводит к остановке последнего и прекращению роста клеток, который наблюдается и в экспериментах *in vitro*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-19-00255-П.

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ СПЛАЙСИНГА В КЛЕТКАХ С НОКАУТОМ ГЕНОВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ мяРНК

Болихова А.К.¹, Марьясина С.С.², Буян А.И.³, Донцова О.А.^{4,5}, Сергиев П.В.^{2,4,5}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт функциональной геномики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт белка РАН, Пушино, Россия

⁴Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

anastasia_b7@mail.ru

Сплайсинг является одним из важнейших этапов созревания большинства РНК в эукариотической клетке. Чаще всего за осуществление данного процесса, заключающегося в вырезании из молекулы РНК интронов и соединении вместе экзонов, отвечает сплайсосомный комплекс. Основой функционирования сплайсосомного комплекса служат пять малых ядерных РНК (мяРНК).

В данной работе мы изучили влияние двух модификаций мяРНК (m^6Am30 в U2 и m^2G72 в U6) на скорость и точность сплайсинга.

Сравнение клеток дикого типа и клеток с нокаутом генов метилтрансфераз, осуществляющих указанные модификации, позволило выявить различия в соотношении альтернативных продуктов сплайсинга. Используя метод выделения новосинтезированной РНК, мы сравнили кинетику сплайсинга в трех клеточных линиях: диком типе и двух линиях без модификаций m^6Am30 в U2 и m^2G72 в U6 соответственно.

Оба нокаута по генам метилтрансфераз показали общее увеличение концентрации интронов по отношению к экзонам и снижение скорости сплайсинга. Данные эффекты были наиболее заметны для ряда генов. В ходе анализа было замечено общее снижение точности сплайсинга у нокаутов, сигнализирующее о важной роли изучаемых модификаций для функционирования сплайсосомы. В свою очередь, анализ зависимости замеченных изменений от типа сайтов сплайсинга продемонстрировал, что степень замедления сплайсинга зависит от положения интрона, но почти не зависит от последовательности сайтов сплайсинга.

Таким образом, удалось показать, что при исчезновении модификаций m⁶Am30 в U2 мяРНК и m²G72 в U6 мяРНК уменьшается точность и скорость сплайсинга, причем данный эффект проявляется в разной степени для разных РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ #21-64-00006.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ

**Бунеева Е.А., Лепехина О.В., Рябова А.С., Арзуманова А.Р., Попович С.А.,
Толкачева А.А., Корнеева О.С., Черенков Д.А.**

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

buneeva5katerina@yandex.ru

Липаза (триацилглицеролацилгидролаза) – это фермент, который катализирует расщепление жиров до более простых веществ (ди- и моноглицеридов, жирных кислот, глицерина). Липазы используют в производстве биодизеля, в пищевой промышленности, производстве кожи и текстильных изделий, а также для получения косметических и средств личной гигиены. Большую часть препаратов липазы для применения в промышленности получают из микробных источников, среди которых наибольший интерес представляют бактерии. Производство нативных липаз не всегда является выгодным в связи с недостаточной стабильностью таких ферментов, чувствительностью к изменениям pH и температуры среды, а также низким выходом продукта. В связи с этим, целью данной работы являлось получение рекомбинантной липазы, которая обладает наибольшей термостабильностью и активностью.

На основании сравнительного анализа физико-химических свойств липаз из различных источников качестве продуцента выбрали бактерию *Bacillus subtilis*, содержащую ген LipA. Генетическую конструкцию собирали на основе плазмидного вектора pET23b+ (Novagen). Экспрессию рекомбинантного гена LipA проводили в клетках *Escherichia coli* Top 10. Активность липазы определяли титриметрическим методом с использованием в качестве субстрата оливкового масла. Термостабильность полученного фермента определяли микрокалориметрическим методом. Полученный рекомбинантный фермент может быть использован в качестве основы для разработки технологии получения коммерческих ферментных препаратов липазы для промышленного применения.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ С-ТЕРМИНАЛЬНОГО ДОМЕНА
ГЕМОЛИЗИНА II *VACILLUS CEREBUS* С ПОЛНОРАЗМЕРНЫМ ТОКСИНОМ ВЫЯВЛЯЕТ
ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТОКСИНА

Ветрова О.С.^{1,3}, Руденко Н.В.¹, Мельник Б.С.⁴, Джомикова Д.Ш.^{1,3}, Замятина А.В.¹,
Каратовская А.П.¹, Марченков В.В.⁴, Нагель А.С.², Андреева-Ковалевская Ж.И.²,
Сиунов А.В.², Солонин А.С.²

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Пушино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино,
Россия

³Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия,

⁴Институт белка РАН, Пушино, Россия

olesja.wetrowa1999@gmail.com

Гемолизин II (НлуII) – порообразующий токсин со структурой типа β -баррель, один из патогенных факторов *Bacillus cereus*. НлуII имеет в своем составе С-концевое удлинение из 94 аминокислотных остатков, обозначаемое как С-концевой домен (НлуIICTD). Иммуноферментным анализом (ИФА) было показано, что моноклональные антитела (МА) НлуIIС-16 и НлуIIС-23, полученные против НлуIICTD, связывались с НлуIICTD гораздо эффективнее, чем с полноразмерным токсином, что свидетельствовало о снижении доступности эпитопов этих МА в молекуле НлуII. Эпитопы НлуIIС-16 и НлуIIС-23 оказываются экранированы в мономере НлуII, что возможно только в случае их расположения в месте сближения С-терминального домена и коровой части токсина. В связи с этими данными была поставлена задача идентифицировать эпитопы, распознаваемые этими антителами. Антигенные детерминанты, или эпитопы, НлуIICTD, узнаваемые антителами НлуIIС-16 и НлуIIС-23, определяли методом пептидного фагового дисплея. Выравнивание последовательностей показало, что пространственные эпитопы исследуемых антител, вероятнее всего, формируют аминокислотные остатки аспарагина (N), глутамина (Q) и пролина (P), расположенные на поверхности домена НлуIICTD. Антитела НлуIIС-16 и НлуIIС-23 эффективно ингибировали взаимодействие друг друга с иммобилизованным НлуIICTD в ИФА, что свидетельствовало о близости их эпитопов на поверхности молекулы НлуIICTD.

С использованием программы Reripitor были определены два участка аминокислотной последовательности НлуIICTD, которые наиболее вероятно узнаются антителами: первый – в начале аминокислотной последовательности НлуIICTD, в области Q321-327, и второй – в области Q353. Так как МА НлуIIС-20, для которого ранее определен эпитоп в области Q327, не ингибировало взаимодействие МА НлуIIС-16 и НлуIIС-23 с НлуIICTD, то можно сделать вывод о том, что эпитоп расположен в области Q353. Эпитоп для антител НлуIIС-16 и НлуIIС-23 является конформационным и формируется сближенными на поверхности белка N350, N352, Q353, K403 и P405. Наличие в его составе P405 подтверждено отсутствием взаимодействия НлуIIС-16 и НлуIIС-23 с укороченной мутантной формой НлуIICTD, в которой этот аминокислотный остаток отсутствует.

Сравнение расположения эпитопов и возможных конформационных поворотов НлуIICTD относительно коровой части токсина с помощью программ ROSIE и AlphaFold

показало, что НпуИСТD ограниченно подвижен и закреплен в транс-конформации в структуре мономерной водорастворимой формы полноразмерного НпуИ-

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10026.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНА (IRR) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА

Гавриленкова А.А.^{1,2}, Деев И.Е.², Бочаров Э.В.^{1,2}, Серова О.В.²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

²Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

gavrilenkova.aa@phystech.edu

Рецептор, подобный рецептору инсулина, принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые являются очень важным звеном при передаче сигнального каскада внутрь клетки, они играют ключевую роль в развитии, дифференцировке, пролиферации и миграции клеток. RTKs состоят из 3х частей: внеклеточная часть, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранный домен (ТМ), и внутриклеточная часть, которая отвечает за фосфорилирование субстратов. В лаборатории клеточной биологии рецепторов ИБХ РАН было показано, что IRR является внеклеточным щелочным сенсором, участвующим в регуляции секреции бикарбоната почками.

Для изучения механизмов активации рецептора IRR в нашей лаборатории, были получены мутантные формы данного рецептора, содержащие одиночные и двойные замены в ТМ домене. Клетки НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IRR с заменами P928A, T927I-G930I, V929E-G930R, V929E, G930R, F942I-F943I, A938E-A939R, A938E, A939E. Спустя двое суток клетки помещали в бессывороточную среду на 3 часа, а после обрабатывали растворами Tris-HCl с различными значениями pH. Далее клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота.

Замены P928A, T927I-G930I, F942I-F943I не влияли на характер активации рецептора. Двойные замены V929E-G930R и A938E-A939R приводили к фосфорилированию рецептора при pH 7,4, в отличие от рецептора дикого типа, который активируется при значениях pH больше 8.0. Мутант V929E-G930R не реагировал на щелочную обработку и имел максимальную активацию при нейтральном pH. Единичные замены V929E и G930R также приводили к фосфорилированию рецептора при pH 7,4. Но в отличие от двойного мутанта, у мутантов с одиночными заменами наблюдалось увеличение уровня фосфорилирования при повышении pH. Одиночная замена A938E в трансмембранном домене IRR также приводит к фосфорилированию рецептора уже при нейтральных значениях pH внеклеточной среды. Напротив, замена A939R в трансмембранном домене рецептора IRR приводит к сдвигу pH чувствительности рецептора в щелочную область. Автофосфорилирование рецептора IRR с двойными заменами V929E-G930R и A938E-A939R при нейтральных значениях pH внеклеточной среды приводит к активации внутриклеточного сигнального белка IRS-1. Это

свидетельствует о том, что данные замены приводят к образованию функционально-активного димера рецептора.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IRR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут привести к изменению характера активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) грант № 23-74-00024.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ – ПЕРЕНОСЧИКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА HSP70

**Гараева Л.А.^{1,3,4}, Комарова Е.Ю.², Емельянова С.С.¹, Гужова И.В.², Маргулис Б.А.²,
Конева А.Л.^{1,3,4}, Штам Т.А.^{1,2,3}**

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» – Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

garaeva.laa@npi.nrcki.ru

На сегодняшний день онкологические заболевания относятся к глобальной проблеме человечества, при этом существующие методы борьбы с опухолевыми новообразованиями в силу соответствующих ограничений не приносят должного эффекта, поэтому поиск эффективных терапевтических подходов в данной области является одной из приоритетных задач. Активация противоопухолевого иммунитета – одно из перспективных направлений в терапии опухолевых новообразований. Существует парадигма, согласно которой экзогенный белок-шаперон HSP70 способен оказывать влияние на активацию противоопухолевого иммунитета посредством выталкивания собственного HSP70 на поверхность клеток, с последующим образованием комплексов высвобожденного HSP70 и фрагментов опухолевых клеток, что приводит к обнаружению таких комплексов антиген-презентирующими клетками, процессингу антигенов и активации цитотоксических лимфоцитов. В свою очередь, эффективная доставка HSP70 к клеткам опухоли могла бы быть осуществлена при помощи растительных везикул.

Таким образом, целью данной работы стала оценка возможности использования нагруженных экзогенным HSP70 внеклеточных везикул, полученных из сока грейпфрута (GF-EVs), для активации противоопухолевого иммунного ответа на клеточных моделях.

В ходе работы была произведена методом проточной цитометрии оценка эффективности доставки экзогенного HSP70 при помощи GF-EVs к клеткам человека *in vitro*. Было показано, что белок, доставленный растительными везикулами, накапливается более эффективно в клетках человека, чем свободный белок.

Также была произведена оценка способности экзогенного HSP70, доставленного к клеткам при помощи GF-EVs, активировать противоопухолевый иммунитет. Клетки меланомы (B16) и карциномы кишечника (CT-26) мыши были соинкубированы со свободным и нагруженным в GF-EVs белком HSP70 с последующим добавлением цитотоксических лимфоцитов, выделенных из селезенки мыши. Жизнеспособность клеток оценивали в реальном времени на приборе xCELLigence. В обеих культурах наблюдалось увеличение скорости гибели клеток, предварительно соинкубированных с белком HSP70 (свободным или в составе GF-EVs), что указывает на активацию противоопухолевого ответа. Более того, нагруженный в GF-EVs белок, концентрация которого на порядок ниже, чем свободно добавленного, действовал с равнозначной эффективностью.

Таким образом, внеклеточные везикулы грейпфрутового происхождения в системах *in vitro* эффективно доставляют к клеткам млекопитающих экзогенный HSP70 с сохранением его способности к активации противоопухолевого иммунного ответа.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 19-74-20146).

ПОИСК ГЕНОВ – АКТИВАТОРОВ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПРОЦЕССА В СТЕНКЕ ТЕЛА ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX*

Гирич А.С.¹, Кравченко Е.В.²

¹ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного
отделения РАН, Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

astromoon@mail.ru

Исследование молекулярных механизмов регенерации проводится на модельных объектах, одним из которых являются голотурии. Интерес к этим беспозвоночным возникает, так как они принадлежат к вторичноротым и имеют хорошие регенераторные способности. Стенка тела голотурий состоит из соединительной ткани, радиальных структур и амбулакров. Каждый из амбулакров образован продольной мышечной лентой, амбулакральным каналом и нервным тяжом. Большая часть самой стенки тела представлена рыхлой соединительной тканью, содержащей большое число различных клеток, в том числе и иммуноцитов.

При регенераторных процессах именно стенка тела является источником морфогенов и клеток для восстановительных процессов. Поэтому методами ПЦР в реальном времени и WMISH у голотурии *Eupentacta fraudatrix* была исследована экспрессия генов лигандов различных сигнальных путей, а также транскрипционных факторов и некоторых генов рецепторов, для того чтобы определить, как они влияют на активацию процессов миграции и дедифференцировки, а также поддерживают состояние ткани для движения клеток.

Так, было выявлено, что на следующий день после эвисцерации аквафарингаельного комплекса (АК) в передней части стенке тела голотурии увеличивается экспрессия гена *bmp2/4*. Интересно что экспрессия других генов *bmp* (*bmp2*, *bmp5/8*) в стенке тела уменьшена при регенераторных процессах, в то время как в регенерирующем АК экспрессия увеличивается в 2-4 раза, по-видимому, для формирования каких-либо специализированных тканей. Также интерес представляет ген *frizzled4*, чья экспрессия повышена как на ранних, так

и на более поздних сроках регенераторных процессов. WMISH показывает локализацию экспрессии гена в зоне перехода стенка тела на регенерирующий АК. В этом месте клетки целомического эпителия мигрируют к регенерату, проходя дедифференцировку. Гены *wnt* преимущественно снижают экспрессию при регенерации. Лишь *wnt4* и *wnt6* увеличивают экспрессию до 4 раз на 7 сут регенерации. Экспрессия происходит в клетка целомического эпителия на достаточно большом участке стенки тела. Транскрипционные факторы в основном экспрессируются в гиподерме, активируя клетки соединительной ткани (*tcf21*, *sox9/10*). Ген *rax2* увеличивая экспрессию в 8 раз в целомическом эпителии интеррадулов стенки тела, области перехода к регенерату АК, сходно с *fz4*.

Таким образом, увеличение экспрессии генов в стенке тела голотурии *E. fraudatrix*, по-видимому, связана с несколькими процессами: 1) активацией клеток гиподермы (*sox9/10*, *tcf21*, *bmp2/4*). 2) активацией клеток целомического эпителия (*wnt4*, *wnt6*) 3) дедифференцировкой (*rax2*, *fz4*).

СТРУКТУРНЫЕ МОТИВЫ И ТРЁХМЕРНЫЕ МОДЕЛИ ХЕЛИКАЗЫ (NS3) И РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ (NS5) ФЛАВИПОДОБНОГО KINDIA TICK VIRUS

Гладышева А.А.^{1,2}, Гладышева А.В.¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия
glastas707@gmail.com

Kindia tick virus (KITV) – новый флавиподобный неклассифицированный вирус с сегментированным геномом группы Jingmen tick virus. Вирусы данной группы являются патогенными для человека и уже обнаруживаются почти на всех континентах Земли. Однако на сегодняшний день имеется очень ограниченная информация о пространственном устройстве их генома, что затрудняет разработку противовирусных препаратов и диагностических тест-систем. Поэтому целью данной работы являлись поиск структурных мотивов вирусных полипептидов и моделирование пространственной структуры вирусных белков NS3 и NS5 KITV.

Установлено, что структурные белки VP1–VP3 KITV не имеют аналогов с известными в настоящее время вирусными белками. Получены пространственные модели неструктурных белков NS3 и NS5 KITV, обладающие высоким уровнем топологического сходства с белками вирусов клещевого энцефалита и денге. В результате анализа моделей пространственных структур и аминокислотных последовательностей белков NS3 и NS5 KITV установлено, что они обладают высоким уровнем топологического и функционального сходства с белками флавириусов, несмотря на низкий уровень схожести аминокислотных последовательностей (менее 30%). Так, NS5 KITV является РНК-зависимой РНК-полимеразой, обладает метилтрансферазной активностью. Белок NS3 обладает хеликазной активностью, но не имеет домена сериновой протеазы, характерного для флавириусов. NS5 и NS3 содержат типичные для флавириусов структурные мотивы А, В, С, D, Е, F и I, Ia, II, III, IV, IVa, V, VI

соответственно и высококонсервативные последовательности, пять из них локализованы в альфа-спиралях, три – в свободных петлях неструктурных белков.

Полученные результаты свидетельствуют о структурном и функциональном сходстве белков NS3 и NS5 нового вируса K1TV с флавивирусами, что принципиально важно для установления его эпидемиологической значимости, организации его мониторинга и создания терапевтических препаратов.

СОЗДАНИЕ БАЗЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ

Дорофеев Н.А.^{1,2}, Сасов Д.А.³, Зубков А.В.^{1,3}

¹Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

²Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

³Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Россия

dorofeev.na@mail.ru

Методы «компьютерного зрения» — методы современной компьютерной технологии, позволяющей обнаруживать и классифицировать объекты, находят своё приложение в анализе биомедицинских изображений, рентгеновских снимков, микрофотографий (как цитологических, так и гистологических). Одной из наиболее изучаемых и социально значимых областей, в которой машинное обучение (МО) востребовано, являются морфологическое исследование микропрепаратов рака молочной железы.

Первым этапом нашей работы стал информационный поиск (оценка возможностей МО в онкоморфологии). Из 8 тыс. опубликованных за 2018-2023 гг. по указанной теме работ для детального анализа отобрано 45 статей. По их данным, метод позволяет выполнять подсчёт и выделение конкретных клеток и тканевых структур, ядер, митозов, оценивать и предсказывать экспрессию иммуногистохимических маркеров, а также рассчитывать комплексные показатели выживаемости, прогноза, клинического течения заболевания/состояния.

Вторым этапом работы стало создание собственной базы изображений гистологических микрофотографий молочной железы, окрашенных гематоксилином и эозином, в норме и при разных патологических процессах (неопухолевые, доброкачественные, злокачественные). На сегодня накоплено более 4,5 тыс. изображений 1920x1440 пикс, разделённых на фотографии оптимального формата для разметки и обучения моделей размером 300x300 пикс (более 135 тыс.).

Третий этап состоял в отборе признаков для аннотирования и проведения пробной разметки. На основе анализа и синтеза результатов опубликованных исследований были выбраны признаки для аннотации, с применением которых будет начата пробная разметка.

Заключение. Начальные этапы исследования по теме машинного обучения являются наиболее ресурсо- и время-затратными, однако именно они определяют результаты последующей работы. Качественно подготовленные данные – критично важный аспект успешной работы всей системы, основанной на «компьютерном зрении», особенно в биологии и медицине.

ПОСТРОЕНИЕ КАРТ АКТИВНОСТИ ИНТЕРНЕЙРОНОВ В ПОЛЕ CA1 ГИППОКАМПА

Дубровин С.В.¹, Мысин И.Е.²

¹Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

sonofatom@mail.ru

Интернейроны — это тормозные нейроны гиппокампа, области мозга, участвующей в формировании памяти. Интернейроны отвечают за модуляцию активности возбуждающих пирамидальных клеток, которые, в свою очередь, работают над формированием памяти. Пирамидные нейроны кодируют пространство. Они разряжаются, когда животное находится в некотором месте пространства. Такие пирамидные нейроны называются клетками места.

Для изучения пространственной активности нейронов гиппокампа во время различных поведенческих тестов используют построение карт активности нейронов, т. е. зависимость частоты разрядов нейронов от положения животного в пространстве. Исследуя пространственную динамику клеток, мы можем лучше понять, как они формируют функциональные связи между собой, и как они активируются в зависимости от когнитивной работы гиппокампа. Роль интернейронов в формировании пространственной активности клеток места непонятна. Последние исследования показывают, что роль интернейронов может заключаться в контрастировании активности пирамидных клеток. Интернейроны сильнее тормозят пирамидные клетки вне их поля места и слабее внутри. Известно, что интернейроны проявляют более слабую пространственную модуляцию, чем пирамидные клетки. Мы предположили, что описывать пространственные карты активности интернейронов можно с помощью локальных максимумов и минимумов, т. е. точек, в которых наиболее сильно могут проявлять свою контрастирующую функцию.

Цель исследования – нахождение максимумов и минимумов и их характерных размеров на пространственных картах из поля CA1 гиппокампа.

Для изучения пространственных карт интернейронов, мы взяли данные из открытого набора данных hc-3 (scns.org) после чего отобрали записи активности интернейронов из поля CA1 с помощью языка программирования Python. Построив карты активности, для их анализа был выбран метод поиска характерных точек (blob detection). В компьютерном зрении данный метод используется для обнаружения на изображении точек отличных от фона. Нами был выбрана свёртка Лапласиан Гауссианы, она представляет собой комбинацию двух производных, которая использует гауссовский фильтр для обнаружения как краев, так и шума. Для поиска точек использовалась библиотека scikit image (<https://scikit-image.org>).

В результате проведённой работы нами были получены характерные точки минимумов и максимумов пространственных карт интернейронов.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-71-10109.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОМНЫХ ПРЕДИКТОРОВ САРКОПЕНИЧЕСКОГО ОЖИРЕНИЯ

Егорова Э.С.¹, Виссарионова А.В.¹, Габдрахманова Л.Д.¹, Ахметов И.И.^{1,2}

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Ливерпульский университет им. Джона Мурса, Ливерпуль, Великобритания

jastspring@yandex.ru

Возрастающее старение населения и увеличение распространённости ожирения связано с новой эпидемией среди пожилых людей – саркопеническим ожирением. Саркопения, обусловленная снижением силы и мышечной массы, усугубляет отрицательные последствия ожирения среди пожилого населения. Распространенность саркопенического ожирения варьирует в зависимости от диагностических критериев и увеличивается у лиц 65 лет и старше, достигая 48,0% и 27,5% у женщин и мужчин соответственно в возрасте старше 80 лет (*Batsis et al.*, 2017).

В настоящий момент не существует методов ранней диагностики саркопенического ожирения в связи с чем целью настоящей работы было выявление геномных предикторов саркопенического ожирения с помощью биоинформационного анализа.

Для достижения заданной цели мы осуществили поиск генетических маркеров, ассоциированных с ожирением, индексом массы тела, жировой массой, туловищной, висцеральной и подкожной жировой массой, соотношением висцеральной и подкожной жировой массы, распределением жира в организме, окружностью талии, индексом талии к бедрам, суммой кожных складок, среди опубликованных GWAS-исследований и неопубликованных данных Британского Биобанка (UKBB) с уровнем значимости $P=5 \times 10^{-8}$. Данный перечень составил 3954 генетических маркеров. Затем из выявленного перечня генетических маркеров мы идентифицировали те варианты генов, протективные аллели которых, ассоциировались с аппендикулярной тощей массой тела (*Pei et al.*, 2020) или безжировой массой тела, а также силой хвата руки с уровнем значимости $P \leq 0.005$.

В результате проведенного биоинформационного анализа 58 GWAS-исследований, а также неопубликованных данных UKBB мы обнаружили 207 генетических маркеро-кандидатов саркопенического ожирения. Недавнее исследование, проведенное с использованием данных британского биобанка, выявило 55 генетических маркера саркопенического ожирения (*Semenova et al.*, 2023). Стоит отметить, что к настоящему моменту не было проведено ни одного полногеномного исследования саркопенического ожирения. Поэтому выявленные с помощью биоинформационного анализа в настоящем исследовании генетические предикторы могут стать инструментом для раннего прогнозирования и профилактики саркопенического ожирения в руках практикующих клиницистов.

Работа поддержана грантом КГМУ № НИР 94-017-2022.

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ РОЛИ КОМПОНЕНТОВ АППАРАТА ИМПОРТА БЕЛКОВ В ПРОЦЕССЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Елизова К.Д.^{1,2}, Тарасенко Т.А.²

¹Иркутский государственный Университет, Иркутск

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

elizova-k@mail.ru

Импорт ДНК в митохондрии – малоизученный клеточный процесс, установление механизма которого открывает возможности для эффективной трансформации митохондриального генома, методология которой еще находится на начальных стадиях своего развития. Известно, что механизм импорта ДНК в митохондрии растений не ограничивается белками VDAC (от англ. Voltage-Dependent Anion Channel) во внешней и адениннуклеотидтранслоказой ANT (от англ. Adenine Nucleotide Translocator) во внутренней митохондриальных мембранах. Перспективными кандидатами на роль альтернативных переносчиков молекул ДНК представляются компоненты крупного трансмембранного комплекса TIM/TOM, отвечающего за импорт белков в митохондриальный матрикс, ввиду участия компонентов комплекса TOM в процессе импорта молекул тРНК. Исследуемыми в рамках работы белками стали TOM9.2, мажорная изоформа центрального компонента рецепторной области комплекса TOM, и изоформы белков комплекса TIM17:23 – TIM23-2 и TIM17-1, принимающие участие в формировании и стабилизации поры для транслокации белков через внутреннюю мембрану.

В митохондрии, выделенные из растений арабидопсиса дикого типа (Col-0) и линий, мутантных по белкам TIM23-2 (*tim23-2*) или TIM17-1 (*tim17-1*), был импортирован чужеродный фрагмент ДНК в присутствии специфических антител к белкам TOM9.2 или VDAC1, ингибирующих их транспортную активность. В присутствии антител к VDAC1 или TOM9.2 уровень импорта ДНК в Col-0 и *tim23-2* снижается в равной степени в отличие от импорта в *tim17-1*, для которого отмечено более выраженное снижение в сравнении как с Col-0, так и с контролем (*tim17-1* без антител). Полученные результаты показали, что белок TIM17-1, но не TIM23-2, наряду с VDAC1 вовлечен в трансмембранный перенос ДНК через митохондриальную мембрану и представляют альтернативный, ранее неизвестный, путь импорта этих макромолекул. Наряду с этим, TOM9.2, вероятно, играет роль в импорте ДНК, причем TOM9.2 и TIM17-1 могут быть участниками одного транспортного канала.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 20-44-383003.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ПИЩЕВЫХ микроРНК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЦИОНА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЭНДОКРИННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Еркинкажина Е.Е., Касымова Ж.Е., Төлеуқанова Т.Т., Бекенкали А.Б.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

eve64486@gmail.com

Исследование влияния диеты на экспрессию генов – это новое направление исследований, результаты которого имеют все шансы повлиять на развитие заболеваний. микроРНК, полученные из пищи, могут взаимодействовать с мРНК, экспрессирующимися при эндокринных заболеваниях, что открывает новые рамки для использования пищевых микроРНК для поддержания здоровья и борьбы с болезнями. Существует значительный интерес к использованию циркулирующих экзогенных микроРНК, полученных из рациона питания, в качестве биомаркеров, и потенциал использования микроРНК может представлять собой новую мощную терапевтическую стратегию для лечения заболеваний. Согласно этой оценке, микроРНК играют важную роль в генезе социально значимых заболеваний, таких как ожирение, диабет, эндокринные заболевания. В данной работе предпринята попытка собрать возможную информацию для подтверждения теории пищевых микроРНК и их действия. Были выявлены механизмы взаимодействия микроРНК и мРНК, транскрибированных с генов, ответственных за возникновение различных типов заболеваний, определены сайты связывания микроРНК и мРНК. Биоинформатический вычислительный подход по определению связывания мРНК и микроРНК был выполнен с использованием новой программы, разработанной учеными нашего факультета.

В базах данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) был проведен поиск генов-мишеней. Благодаря публикациям, размещенным на сайте (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), была выявлена связь 2010 генов с различными заболеваниями. При этом была выделена группа соответствующих генов, участвующих в возникновении патологии для основных типов эндокринных заболеваний. Нуклеотидные последовательности 6596 микроРНК были загружены с сайта miRBase (<http://www.mirbase.org/>). В процессе работы выяснилось, что некоторые гены и микроРНК связаны с несколькими эндокринными заболеваниями. Биоинформационный расчет характеристик связывания генов заболеваний и микроРНК проводился с помощью программы NewGeneralScanning.

В результате этой работы были определены микроРНК и сайты связывания с мРНК, транскрибируемых с генов-мишеней, участвующих в развитии эндокринных заболеваний. Установлены особенности взаимодействия микроРНК с ассоциированными генами, а также 142 гена, ответственных за развитие заболеваний и экспрессия которых нарушается при заболеваниях. Эта группа включает гены *ABCC8*, *ACE*, *ACSL1*, *ACVR1B*, *ADD1*, *ADDR2*, *ADDR1*, *AHSG*, *AKT2*, *ANGPTL8*, *APC*, *APOA1*, *APOA5*, *AQP4*, *ARMC5*, *ATM*, *ATPIA1*, *ATP2A2*, *ATP2A3*, *ATRNL1*, *ATXN2L*, *BAX*, *BDNF*, *BMP2*, *BMP4*, *BSCL2*, *CACNA1D*, *CARTPT*, *CCN2*, *CCND1*, *CD2AP*, *CD81*, *CDH23*, *CDK5R1*, *CDON*, *CISD2* и т.д. Согласно полученным результатам, высокими показателями обладают микроРНК *Bos taurus*, *Gallus*, *Equus caballus*. И *miR-169c-3p* из *Citrus sinensis*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays* показала высокий балл в пределах гена *APC*. Все сайты связывания локализованы в 5'-нетранслируемой области исследуемых генов. Анализ взаимодействий микроРНК и генов мРНК выявил группу

микроРНК, а именно, *miR-23b*, *miR-12030*, *miR-9007*, *miR-1582*, *miR-1648-5p*, *miR-1637*, *miR-2127*, *miR-11976*, *miR-7475-5p*, *miR-2885*, *miR-1281*, *miR-3141*, *miR-1552-3p*, *miR-12023*, *miR-8989*, *miR-1281*, *miR-6552-5p*, *miR-1770*, *miR-2331-3p*, *miR-6528*, *miR-12243-3p*, *miR-390b*, *miR-390b-5p*, *miR-390d*, *miR-390-5p*, *miR-390*, которые участвуют в проявлении эндокринных заболеваний.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CSN1S1 У КОЗ МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ

Жаркова Е.К., Беломестнов К.А., Тимофеева К.Н., Чылбак-оол С.А.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия

ekzharkova@rgau-msha.ru

Домашняя коза (*Capra hircus*) широко распространена в мире и представлена большим породным разнообразием благодаря своим биологическим особенностям, в частности высокой адаптивности к различным климатическим условиям содержания. В настоящее время для ускоренного развития козоводства недостаточно использовать только традиционные методы, в связи с чем возрастает необходимость интеграции в селекционный процесс современных ДНК-технологий, поскольку они позволяют повысить эффективность селекции посредством отбора носителей аллелей, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками. В молочном козоводстве наибольший интерес представляет полиморфизм в генах казеина. Выявлены убедительные доказательства связи генотипов альфа-казеина (CSN1S1) и других генов с молочной продуктивностью и сыродельческими качествами козьего молока. Однако исследований, посвященных влиянию полиморфизма разных генов на молочную продуктивность коз, выполнено недостаточно.

В связи с этим, целью работы было установление полиморфизма в гене CSN1S1 для дальнейшего определения его влияния на продуктивность коз пород альпийская, нубийская и мурсиано гранаина. Исследование проводили в группах по 40 голов для каждой породы методом PCR-RFLP. Определение уровня изменчивости и дифференциации производилось путем вычисления генетических параметров, характеризующих исследуемые популяции, в программе POPGENE Version 1.32.

В результате проведения молекулярно-генетических исследований у коз пород альпийская, нубийская и мурсиано гранаина в семнадцатом экзоне гена казеина (CSN1S1) была изучена миссенс-мутация в 139 позиции (A→G), приводящая к замене аминокислоты треонин (Thr) на аланин (Ala). Установлено, что в исследованных породах полиморфизм гена CSN1S1 представлен мутантным аллелем CSN1S1A и диким аллелем CSN1S1B с разной частотой встречаемости. У коз нубийской породы превалировал CSN1S1B, а в породах альпийская и мурсиано гранаина – CSN1S1A. Частота встречаемости аллеля CSN1S1B превалировала у коз породы нубийская и составила 0,550, у коз пород альпийская и мурсиано гранаина наиболее встречаемым был аллель CSN1S1A, который выявлялся с частотой 0,625 у альпийской породы и 0,550 – мурсиано гранаина.

Для оценки значимости селективного различия между генотипами и соответствия фактических частот генотипов теоретически ожидаемым согласно закону Харди-Вайнберга был рассчитан критерий соответствия Пирсона (χ^2). Установлено, что в породах альпийская и мурсиано гранадина генетическое равновесие смещено в сторону гетерозиготных генотипов – CSN1S1AB ($\chi^2 = 13,85$ и $19,86$ соответственно). В нубийской породе прослеживалось соответствие фактических частот теоретически ожидаемым ($\chi^2 = 3,61$)

Исходя из того, что аллель CSN1S1A определяет лучшую пригодность молока для изготовления сыра и собственных результатов генотипирования, свидетельствующих о большем числе носителей генотипа CSN1S1AA (0,25) среди коз альпийской породы, позволяет сделать вывод о том, что их разведение более эффективно для этих целей, чем коз пород нубийская и мурсиано гранадина, у которых генотип CSN1S1AA встречается в два раза реже (0,125).

Работа поддержана программой Приоритет 2030.

АГРЕГАТЫ NOS1AP, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК293Т, НЕ ОБЛАДАЮТ АМИЛОИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ

**Зудилова А.А.¹, Матив А.Б.¹, Данилов Л.Г.¹, Москаленко С.Е.^{1,2},
Журавлева Г.А.^{1,3}, Бондарев С.А.^{1,3}**

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова,
Санкт-Петербург, Россия

³Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

aniuta.zudilova@gmail.com

NOS1AP представляет собой адаптерный белок нейрональной синтазы оксида азота и участвует в клеточном сигналинге. Существует ряд работ, указывающих на участие NOS1AP в развитии психических расстройств, в частности, шизофрении. Например, у людей с этим расстройством наблюдается увеличение количества этого белка. В нашей лаборатории было показано, что сверхпродукция белка NOS1AP приводит к его агрегации. Известно, что некоторые белки при агрегации могут образовывать амилоиды – белковые фибриллы с кросс-бета-структурой. На сегодняшний день одним из самых надежных методов выявления амилоидов является связывание с красителем Конго красным. Ранее было выдвинуто предположение о том, что агрегаты NOS1AP в клетках не обладают амилоидными свойствами, но доказательств этой гипотезы не было.

В представленной работе мы оптимизировали метод ко-иммунопреципитации для выделения EGFP-NOS1AP из клеток линии НЕК293Т, подобрав необходимую концентрацию поликлональных антител к NOS1AP. Образцы, полученные в результате ко-иммунопреципитации, были окрашены Конго красным. Затем мы исследовали эти препараты с помощью поляризационной микроскопии и не выявили яблочно-зеленого свечения, характерного для амилоидов, что является доказательством неамилоидной природы агрегатов NOS1AP, формирующихся в культуре клеток человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-74-10042 и Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярно-клеточных технологий».

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ШАПЕРОНИНА БАКТЕРИОФАГА ОВР

**Зюркалова Д.В.¹, Джус У.Ф.¹, Курочкина Л.П.², Никулин А.Д.¹,
Габдулхаков А.Г.¹, Петрова Т.Е.³**

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

³Институт математических проблем биологии, филиал ИПМ им М.В. Келдыша, РАН,
Пушино, Россия

dzyurkalova@yandex.ru

Шаперонины – это класс белков, способствующих восстановлению нативной структуры белка. На данный момент известны 2 группы шаперонинов: шаперонины группы I, находящиеся в прокариотических клетках, а также в эукариотических органеллах, и шаперонины группы II – локализованные в эукариотических клетках. Сравнительно недавно впервые были описаны немногочисленные представители шаперонинов бактериофагов, одним из которых является шаперонин бактериофага ОВР. Ранее уникальная модель этого шаперонина была реконструирована с помощью крио-электронной микроскопии с разрешением 4.5 Å [1]. Модель представляет собой гептамерное несимметричное кольцо, субъединицы которого идентичны по последовательности, но находятся в разных пространственных конформациях (по 3 субъединицы в конформации А или В и одна в конформации С). Каждая из субъединиц состоит из трех доменов: экваториального, среднего и апикального. Между собой конформации субъединиц отличаются поворотами на уровне среднего и апикального домена, при этом область экваториальных доменов является неизменяемой и самой структурированной частью молекулы.

Нами были получены кристаллы шаперонина бактериофага ОВР и собраны рентгеновские дифракционные данные до разрешения 3.37 Å. Модель, полученная с помощью крио-электронной микроскопии, использовалась в качестве стартовой при решении кристаллической структуры. В элементарной ячейке кристалла расположены 4 кольца шаперонина бактериофага ОВР, ориентированные друг к другу в виде стопок. В целях улучшения качества полученной модели полноразмерного белка дополнительно нами был получен и закристаллизован препарат изолированного апикального (наиболее разупорядоченного) домена отдельной субъединицы (со 191 по 325 аминокислотный остаток). Были собраны дифракционные данные до разрешения 2.6 Å. Структуру апикального домена с высоким разрешением использовали для уточнения структуры полноразмерной молекулы шаперонина бактериофага ОВР. В результате была получена модель более высокого качества – R-фактор уменьшился на 0.05. На данный момент значение R-фактора – 0.22, а R-free – 0.25. Сравнение моделей, полученных с помощью крио-электронной микроскопии и РСА, показало значительные отличия как в пространственной структуре субъединиц, особенно в области апикального домена, так и в конформации отдельных субъединиц в составе кольца шаперонина.

[1] Stanishneva-Konovalova TB, Semenyuk PI, Kurochkina LP et al. Cryo-EM reveals an asymmetry in a novel single-ring viral chaperonin. *J Struct Biol.* 2020. 209(2):107439. doi: 10.1016/j.jsb.2019.107439.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ НИКУЮЩЕЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ CYS-FREE Nt.BSPD6I В АВТОНОМНОМ ПАКЕТЕ AGGRESKAN 3D (A3D)

Илюхина А.А.¹, Антипова В.Н.², Артюх Р.И.², Юнусова А.К.²

¹Тулский государственный университет, Естественнонаучный институт, Тула, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

ilukxinaanya@gmail.com

Никующая эндонуклеаза Nt.BspD6I (никаза) была описана как самостоятельный мономерный фермент, который узнает в двухцепочечной ДНК короткую специфическую последовательность (5'-GAGTC-3') и вносит разрыв (nick) только в одну, predeterminedную, цепь ДНК на фиксированном расстоянии от узнаваемой последовательности (Perevyazova et al., 2003). Позднее было установлено, что никаза является большой субъединицей гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I, которая расщепляет ДНК по двум цепям (Yunusova et al., 2006).

Cys-free Nt.BspD6I это мутантная форма никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I, в которой четыре остатка цистеина заменены на серин в положениях: Cys11, Cys160, Cys508 и Cys 578. Остатки цистеинов редко встречаются в молекулах белка. При наличии цистеинов высокая реакционная способность их тиольных групп обуславливает присутствие этих остатков в активных центрах белков. Кроме того, способность цистеинов образовывать дисульфидные связи и координационную связь с металлами обеспечивает поддержание стабильной структуры молекулы белка. Структурный анализ Cys-free Nt.BspD6I показал, что замена цистеинов индуцирует заметные конформационные изменения в области N- концевой узнающего и C-концевого каталитического доменов, а биохимический анализ выявил значительное снижение активности гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции Cys-free R.BspD6I (Artyukh et al., 2022).

Также было показано, что Cys-free Nt.BspD6I имеет заметную склонность к образованию олигомерных форм. С целью установления возможной причины олигомеризации мутантной формы никующей эндонуклеазы выполнили анализ её структуры с помощью Aggrescan3D (A3D) (<https://bitbucket.org/lcbio/aggrescan3d>), автономного мультиплатформенного пакета Python для прогнозирования свойств агрегации белков, стабильности и рационального проектирования их растворимости (Kuriata et al., 2019).

A3D-анализ кристаллической структуры Cys-free Nt.BspD6I (PDB: 5LIZ), выполненный в статистическом режиме с радиусом 10 Å, выявил область, очень склонную к агрегации. Она состоит из 6 следующих друг за другом аминокислотных остатков (Leu53, Pro54, Gln55, Phe56, Leu57, Gly58), где Phe56 и Leu57 это остатки с наибольшей склонностью к агрегации в структуре белка (A3D score 2,0507 и 1,5694, соответственно).

Поскольку мутации могут влиять на структурную стабильность белка, приводя в том числе и к агрегации, был выполнен расчет стабильности. Энергетическая разница между Nt.BspD6I и Cys-free Nt.BspD6I составила 16,2158 кДж/моль. Это показывает, что замена всех цистеинов значительно дестабилизировала структуру белка.

Увеличение концентрации олигомерных форм Cys-free Nt.BspD6I может быть связано как с термодинамической нестабильностью белка, так и наличием участка, склонного к агрегации.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-01025-23-00.

Литература.

1. T.A. Perevyazova et al., *Biochemistry (Mosc)* 68, 984–987 (2003).
2. A.K. Yunusova et al., *Biochemistry J.* 71, 815–820 (2006).
3. R.I. Artyukh et al., *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 1870(3):140756 (2022).
4. A. Kuriata et al., *Bioinformatics*, V.35 (19) (2019).

ИЗМЕНЕНИЕ ТРЁХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА В ЛОКУСЕ *KIT* МЫШИ ПРИВОДИТ К ЭКТОПИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ЭКСПРЕССИИ И ЗАВИСИТ ОТ КЛЕТОЧНОГО ТИПА

Кабирова Э.М.^{1,2}, Лукьянчиков В.А.¹, Рыжкова А.С.¹, Хабарова А.А.¹, Баттулин Н.Р.^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

kabevelyn@gmail.com

Активация экспрессии гена требует физического сближения энхансера с его промотором. Такое взаимодействие обеспечивают топологически ассоциированные домены (ТАДы). Для формирования ТАДов белок когезин выпетливает хроматин до столкновения с белком CTCF. Было показано, что нарушение структуры ТАДа – например, отсутствие на границе ТАДа CTCF-сайта – может иметь патологические проявления: пороки развития конечностей, IDH мутантная глиома. Однако такая роль ТАДов не универсальна, и в работах на других локусах функционального изменения из-за нарушения ТАДов не наблюдают. Это противоречие поднимает вопрос: вносят ли ТАДы вклад в регуляцию экспрессии генов?

Для решения этой проблемы мы разработали *in vivo* модель – линии мышей с удаленными CTCF-сайтами на границе ТАДов в локусе *Kit*. Особенность этого локуса заключается в том, что в двух соседних ТАДах расположены гены *Kit* и *Kdr* с контрастной экспрессией: *Kit* активен в тучных клетках и меланоцитах (*Kdr* неактивен), а *Kdr* активен в эндотелиальных клетках (*Kit* неактивен). Мы предположили, что удаление границы ТАДов между ними позволит энхансерам *Kit* эктопически активировать ген *Kdr* в тучных клетках и меланоцитах. Новизна нашей работы состоит в исследовании нарушения пространственной организации *одного* локуса при *разных* регуляторных ландшафтах двух клеточных типов.

Мы обнаружили, что нарушение структуры ТАДов приводит к эктопической активации *Kdr*, но только в меланоцитах. Мы полагаем, что это объяснимо различным эпигенетическим ландшафтом локуса в меланоцитах и тучных клетках: расположением энхансеров и уровнем экспрессии гена *Kit*.

Полученные результаты позволяют заключить, что, хотя ТАДы вносят вклад в регуляцию экспрессии, их роль не является ключевой и зависит от других факторов, локус- и ткане-специфичность которых может объяснить противоречивость ранее получаемых результатов о регуляторной функции ТАДов.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00247.

СОЗДАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗУБНОЙ ЭМАЛИ

Калинина А.Е.¹, Савельева П.Д.¹, Нурғалиев И.М.², Кошель Е.И.¹

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

²ООО «ЛабПэк», Санкт-Петербург, Россия

kalininaanastasia71@gmail.com

Введение. Кариес – ведущая проблема в мировой стоматологии, одна из тенденций в способах предотвращения его развития является профилактика здоровых интактных зубов. Устранять причины развития поврежденной зубной эмали эффективнее и выгоднее в долгосрочной перспективе, нежели устранять последствия.

В этой связи, актуальным является разработка биотехнологических средств, снижающих вероятность возникновения нового кариеса на здоровых молочных и постоянных зубах путем циклического использования. Амелогенин человека – внеклеточный белок эмали, секретируемый амелобластами, может применяться для ускорения регенерации тканей полости рта после травм, вызванных заболеваниями, такими как кариес зубов, поскольку этот белок естественным образом экспрессируется в нескольких тканях человеческих зубов, таких как эмаль и пульпа, он безопасен для человеческого организма.

Кроме того, после кодонной оптимизации нуклеотидной последовательности белок может быть относительно экономично получен в бактериальной системе – *Escherichia coli*, хорошо изученной для генно-инженерных манипуляций, а также *Lactococcus lactis* или *Lactobacillus casei* – перспективные экспрессионные системы для безвредного использования человеком, это оральные комменсалы, способные буферизировать кислоту, вырабатываемую кариозными бактериями, выделяя щелочные побочные продукты метаболизма и впоследствии повышая рН слюны, следовательно, бактерии рода *Lactococcus*, *Lactobacillus* не только безвредны для человека, но и полезны. В связи с этим, целью данного исследования стало создание генно-инженерной конструкции на основе этих организмов для восстановления эмали.

Основная часть. С помощью биоинформатического анализа и генно-инженерных манипуляций в процессе работы решаются следующие задачи:

Проектирование и сборка различных схем генетической конструкции AMELX *in silico*.

Редактирование мутаций в полной последовательности и сборка экспрессионных конструкций.

Получение рекомбинантного штамма *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, несущего генетическую конструкцию для синтеза амелогенина.

Получение продуцента рекомбинантного белка амелогенина.

Оптимизация производства и очистки белковой биомассы.

Получение производителя пробиотического белка.

Тест генетической конструкции на клеточных линиях и животных.

Выводы. Проведена сборка различных схем генетической конструкции AMELX *in silico* с рестрикционными сайтами для последующего клонирования последовательности в экспрессионный вектор, разработана методика сборки экспрессионной системы и получения рекомбинантного белка, произведены расчеты и оценка производства и очистки белковой массы.

BAZ1B КАК РЕГУЛЯТОР НЕЙРАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Киссер М-С.М.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Россия, Москва

arahna1984@mail.ru

Гиперсоциальное поведение у людей (синдром Вильямса-Берена – WBSR) ассоциировано с делециями/дупликациями района хромосомы 7, включающего 28 генов, генетическое сцепление которых эволюционно консервативно у млекопитающих. Связь между мутациями в этом районе и гиперсоциальной активностью описана, в частности, у собак. Особый интерес среди этих генов привлекает ген *baz1b*, так как является фактором регуляции транскрипции около 448-ми генов. Обнаружено, что именно делеции *baz1b* приводят к формированию сложного когнитивного фенотипа, который можно наблюдать при синдроме Вильямса-Берена у человека. Другое важное свойство гена заключается в образовании В-WICH комплекса ремоделинга хроматина, который выполняет роль эпигенетической регуляции хроматина. Известно, что трехмерная структура генома тесно связана со многими биологическими процессами в ядре, в том числе и с взаимодействиями между энхансерами и промоторами генов, контролирующими изменчивость профилей генной экспрессии. Одним из генов-маркеров нейрального эмбрионального развития, является *sox2*, он играет ключевую роль в нейрогенезе, нейрональной и глиальной дифференцировке клеток. По имеющимся данным, экспрессия *sox2* имеет прямую корреляцию с уровнем экспрессии *baz1b*. В работе выполнен анализ накопленных экспериментальных данных, позволяющий оценить пути вовлечения гена *baz1b* в синдром гиперсоциальности, начиная от скорости деления периферических клеток нервного гребня. Получены данные, свидетельствующие о том, что продукт гена *baz1b* способствует регулированию баланса между темпами клеточного деления и дифференцировкой нейронных предшественников. При дефиците *baz1b* наблюдается сверхактивная передача сигналов Wnt в эмбриональном развитии, что приводит к увеличению пролиферации и уменьшению дифференцировки нервных клеток. Таким образом, на основании накопленных данных, впервые выдвинуто предположение о механизмах вовлеченности *baz1b* в эволюционно консервативный комплекс генов, связанных с синдромом гиперсоциальности.

ПРОФИЛИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА МИОКАРДА ПАЦИЕНТОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

**Класс А.Л.¹, Власов И.Н.¹, Шадрин М.И.¹, Сломинский П.А.¹, Лысенко А.В.²,
Салагаев Г.И.², Филатова Е.В.¹**

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

²Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

annaklass@img.msk.ru

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является самым распространенным наследственным заболеванием сердца и проявляется в форме выраженной гипертрофии миокарда, преимущественно левого желудочка (ЛЖ). Разнообразная генетическая компонента патологии обуславливает сильную вариабельность клинической картины. Однако несмотря на многие годы исследований, молекулярно-генетический механизм патогенеза ГКМП до сих пор остается недостаточно изученным, что усложняет разработку терапевтических подходов. Таким образом, до сих пор остается актуальным изучение молекулярных нарушений, сопутствующих прогрессированию ГКМП. В связи с этим, целью данного исследования было изучение особенностей полнотранскриптомного профиля образцов миокарда пациентов с тяжелой формой ГКМП.

В данной работе было проведено полнотранскриптомное секвенирование образцов миокарда, полученных от 24 пациентов с тяжелой формой ГКМП в рамках хирургического лечения (септальная миоэктомия). Секвенирование полного транскриптома осуществляли на базе платформы HiSeq 2500 (Illumina, США). В качестве группы сравнения использовали данные секвенирования образцов здоровых донорских сердец, опубликованные в GEO (GSE89714; GSE141910; GSE160997; GSE180313). Всего было выявлено 144 дифференциально экспрессирующихся гена (ДЭГ). Анализ генных сетей выполнен с помощью базы данных Gene Ontology (GO) и плагина ClueGO для программы Cytoscape 3.9.1. В результате было выявлено, что обнаруженные ДЭГ в основном задействованы в биологических процессах, связанных с регуляцией кровяного давления, воспалительными реакциями и иммунным ответом. Полученные результаты позволят расширить представление о механизмах патогенеза тяжелой формы ГКМП, что в будущем может способствовать разработке терапевтических подходов с учетом индивидуальных особенностей пациентов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00243.

ПРОБЛЕМА СОРБЦИИ ДНК НА ПОЧВЕННЫХ ЧАСТИЦАХ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОМОВ

Ковальчук А.И.^{1,2}, Крюков А.А.², Горбунова А.О.², Кудряшова Т.Р.^{1,2}, Юрков А.П.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, Россия

kovalchuk.ai@edu.spbstu.ru

Анализ состава микробиома почв молекулярно-генетическими методами является распространенной процедурой в изучении биоразнообразия микроорганизмов. Кроме наличия в почвах ингибирующих ПЦР агентов (в основном гуминовых кислот) проблемой также является сорбция нуклеиновых кислот (НК) на почвенных частицах. Первая проблема более значима в черноземах, вторая — в песчаных почвах. Проблема сорбции ДНК на глинистых компонентах почвы решается использованием блокирующих агентов органического или неорганического происхождения (фосфат-ионы PO_4^{3-} , белки, модифицированные нуклеотиды и др.), на центрах связывания глинистых частиц, а также селективным удалением поливалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) из почвенных суспензий с помощью хелатирующих агентов, таких как EDTA.

В своей работе мы использовали дополнительный смыв НК с почвы водой после обработки ее СТАВ для экстракции. После отбора СТАВ с ДНК в новую пробирку, мы добавляли 600 мкл воды в пробирку с почвой, нагревали до 45°C , гомогенизировали на вортексе в течение 10 мин, центрифугировали. После чего, супернатант с водой объединяли со СТАВ и далее проводили чистку ДНК двукратной экстракцией хлороформом. В результате таких процедур выход ДНК повышался в 1,5-2 раза. Это может быть особенно важно для выявления редких последовательностей НК, например, при анализе грибов арбускулярной микоризы, доля которых не превышает 2-3% от других микроорганизмов в почве.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-16-00064 и государственным заданием № FGEW-2021-0004.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛОК КОДИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК ЧЕЛОВЕКА DLEU2

Кони́на Д.О.^{1,2}, Фи́латова А.Ю.², Вяхи́рева Ю.В.², Скоблов М.Ю.¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

²Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

darya.konina@phystech.edu

Транскриптомные исследования, проведенные в последние десятилетия, показали, что 80% генома человека транскрибируется. Значимая часть РНК, экспрессирующейся в клетке, приходится на гены длинных некодирующих РНК (днРНК). В соответствии с последними данными проектов GENCODE и FANTOM количество генов днРНК человека сопоставимо или даже немного превышает количество белок-кодирующих генов, однако только для малой части днРНК определена их функция. При этом уже доказано, что днРНК могут участвовать во многих ключевых клеточных процессах, включая регуляцию экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Также недавние исследования показали, что около половины днРНК связываются с рибосомами и предположительно транслируются. Таким образом, функция длинных некодирующих РНК может быть связана как с действием самой молекулы РНК, так и с её кодирующим потенциалом. Подтверждение бифункциональности молекул РНК, указывает на необходимость пересмотра роли днРНК в клетках в масштабе всего генома.

Данная работа посвящена анализу белок кодирующего потенциала длинной некодирующей РНК человека DLEU2 с использованием биоинформатических методов. Исследование кодирующего потенциала DLEU2 позволит лучше понять сложность механизмов регуляции клеточных процессов.

DLEU2 – одна из первых идентифицированных днРНК, обнаруженная путем секвенирования области 13q14, в которой часто обнаруживаются делеции при лейкозе. Анализ баз данных RefSeq и GENCODE выявил возможные изоформы исследуемой РНК. Кроме того, в геноме человека описан процессированный псевдоген DLEU2L. Сравнительный анализ выявил, что последовательности транскриптов DLEU2 и DLEU2L совпадают более чем на 90%. С помощью данных проектов GTEx (Genotype-Tissue expression), TCGA (The Cancer Genome Atlas) и FANTOM5 изучен характер экспрессии транскрипта DLEU2. Показано, что он экспрессируется во многих тканях и клеточных линиях человека и не имеет выраженной тканеспецифичности. С использованием инструмента GEPIA 2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) было выявлено, что уровень экспрессии DLEU2 значимо изменяется в некоторых типах опухолей относительно соответствующих нормальных тканей, что подтверждается литературными данными и свидетельствует о его роли в развитии онкологических заболеваний. С помощью браузеров GWIPS-viz и TRIPS-viz, включающих в себя данные рибосомного профилирования, определили, что DLEU2 имеет сильную ассоциацию с рибосомой и предсказали наличие трех коротких открытых рамок считывания. Последующий анализ Козак последовательностей сайтов инициации трансляции и консервативности идентифицированных рамок позволил отобрать две короткие открытые рамки считывания (ORF1 – CGAGTGATGCCTGATCTCATCAATCTAGCGGGAGAGACAGGATAA, ORF2 – ATGCATTGGAACATGACATGA) для последующего изучения. Проведена сравнительная оценка трансляции для DLEU2 и DLEU2L, показано, что для псевдогена характер трансляции не сохраняется.

МОНОГЕННЫЙ И МУЛЬТИГЕННЫЙ ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ХЕМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Копылова Е.Е.¹, Соколов В.В.¹, Кабанова Н.В.¹, Ковалицкая Ю.А.¹,
Коваленко Н.П.¹, Быстрова М.Ф.¹**

¹Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

ikopylov76@gmail.com

Гены обонятельных рецепторов (ОР) составляют самое большое семейство в геномах млекопитающих, что обеспечивает феноменальную чувствительность и способность распознавать широкий спектр запахов. Так, в геноме мыши аннотировано 1360 генов. Считается, что индивидуальный нейрон экспрессирует преимущественно один продукт из этого набора. Механизмы, определяющие селекцию нужного гена до сих пор неизвестны. Однако секвенирование транскриптомов одиночных обонятельных нейронов свидетельствует о возможности транскрипции нескольких рецепторных генов в зрелых обонятельных нейронах. Более того, транскрипты генов обонятельных рецепторов обнаруживаются и в других тканях, не связанных с обонянием. В данной работе был проанализирован рецепторный репертуар одиночных обонятельных нейронов, клеток инсулиномы мышей MIN6, островков Лангерганса и клеток вомероназального органа мышей. Для идентификации экспрессируемых генов использован подход, основанный на создании клонотек кДНК транскриптов. Для каждого типа клеток конструировали таргетную клонотеку кДНК ОР, используя для амплификации универсальные вырожденные праймеры. Скрининг клонотек проводили методом секвенирования по Сэнгрегу. Идентификацию генов ОР проводили путем выравнивания нуклеотидных последовательностей образцов клонотеки на геном *Mus musculus*.

Для одиночных обонятельных нейронов обнаружено, что в ~ 20% случаев действительно экспрессируется один рецептор, в 25 % образцов выявляются транскрипты двух генов с очевидным превалированием одного. В третьем случае обнаруживаются транскрипты от двух до четырех рецепторов. Для этого варианта нейронов мажорные множественные транскрипты присутствуют в следующих сочетаниях: *Or8k35* и *Or4c109* (60,7 и 32,14 % соответственно); *Or6z6* и *Or4c116* (57,7 и 34,6%); *Or4p8* и *Or6z6* (68,4 и 21,1%); *Or4e1* и *Or4c113* (48 и 36%). Полученные результаты позволяют заключить, что в обонятельных нейронах могут экспрессироваться гены как одного, так и нескольких ОР. В индивидуальных моноклонах MIN6 стабильно выявляются транскрипты *Or10j5* и *Or4a47*, которые при этом представлены в сочетании с минорными продуктами от 2 до 6 других генов. Таким образом, эктопическая экспрессия обонятельных рецепторов также может носить мультигенный характер.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №22-24-00860.

ПОИСК МИШЕНЕЙ ДЛЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ЗЕЛЕННОЙ ПЕРСИКОВОЙ ТЛИ (*MYZUS PERSICAE*)

Кудрявцева Ю.С., Тимофеев С.А., Долгих В.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург, Россия

yulia_kyd@mail.ru

Насекомые-вредители наносят прямой и косвенный ущерб посевам и несут ответственность за миллионы долларов и потери растениеводства во всем мире. Тли (*Hemiptera: Aphididae*) — самая многочисленная группа насекомых, питающиеся преимущественно соком флоэмы растений. Сильно зараженные растения обычно отстают в росте слабые и имеют пониженный фотосинтез, что может привести к снижению урожайности сельскохозяйственных культур. Из 4700 тлей видов, описанных на сегодняшний день, было доказано, что более 190 передают вирусы растений большинству важные в мире сельскохозяйственные культуры. Зеленая персиковая тля (GPA), *Myzus persicae* (Sulzer), является полифагом. насекомое, которое питается растениями из более чем 40 различных семейств, включая Brassicaceae и Solanaceae, а также является переносчиком более 100 вирусов.

Одним из перспективных и безопасных для окружающей среды и человека методов защиты растений является применение препаратов, блокирующих экспрессию жизненно-важных генов вредителей за счет РНК-интерференции. В этой работе мы осуществили поиск новых генов, подходящих для применения подобных методик у зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*). Из насекомых была выделена мРНК и на ее основании создана библиотека кДНК, которая далее была встроена в модифицированную плазмиду pRSET с дополнительным промотором, позволяющую осуществить экспрессию библиотеки генов тли в виде двуцепочечных молекул РНК (дцРНК), способных запускать реакцию РНК-интерференции в организме насекомых.

Также нами была разработана методика культивирования зеленой персиковой тли на искусственной питательной среде, которая позволяет поддерживать культуру насекомого без использования растений.

Сейчас мы приступили к анализу фрагментов ДНК, клонированных при создании библиотеки и комплементарных различным генам, их экспрессии в виде дцРНК и изучению их способности убивать зеленую персиковую тлю в созданной нами культуре насекомых.

ПОИСК ЛИГАНДОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК
ESCHERICHIA COLI

Кузнецова У.Д.¹, Магкаев А.Т.¹, Тутукина М.Н.^{2,3}

¹ГБОУ школа имени Маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

³Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН, Москва, Россия

KuznetzovaY@yandex.ru

Биоплёнки – это конгломерат клеток, заключенный в экзополисахаридный матрикс. Они являются источником многих опасных инфекций, которые плохо поддаются лечению стандартными методами. Поэтому резистентность бактериальных биопленок к антимикробным препаратам является важной и актуальной проблемой, а понимание процессов образования биопленок может быть важно для создания более эффективных антибактериальных лекарств.

Цель работы – выяснить, какие белки влияют на образование биопленок; найти вещества, которые могут блокировать деятельность этих белков и проверить их эффективность. Для работы на основании имеющихся данных были выбраны следующие факторы транскрипции: YjjM, H-NS, IHF, UxuR, Dps ExuR. Для оценки того, влияют ли данные белки на образование биоплёнок энтеропатогенными штаммами кишечной палочки (EPEC), и поиска мутаций был произведен анализ аминокислотных последовательностей белков в 51 геноме штаммов EPEC. На основании филогенетических деревьев мы предположили, что YjjM, UxuR, Dps могут влиять на способность образовывать биопленки у бактерий, поэтому эти белки были выбраны для поиска низкомолекулярных веществ, модулирующих их ДНК-связывающую активность. Затем были смоделированы структуры этих белков из штаммов EPEC и K-12 MG1655, проведён докинг и рассчитана свободная энергия связывания потенциальных лигандов с тем или иным белком. В ходе докинга выяснилось, что наименьшей энергией связывания с белками обладают cAMP, GMP, D-глюкуроновая кислота, D-галактуриновая кислота, триптофан и мелатонин.

Затем мы проверили наши расчеты. На 96-луночные планшеты было высеяно два штамма: пробиотический *Escherichia coli* Nissle 1917 и штамм дикого типа *Escherichia coli* K-12 MG1655, в среде M9 в присутствии 0.2% D-галактуриновой кислоты, маннозы, лактозы, а также глюкозы в качестве контроля. Манноза была взята в качестве соединения, которое уже используется в клинической практике для предотвращения прикрепления бактерий к клеткам эпителия. Бактерий растили при 37°C в течение 48 часов, после чего измерили оптическую плотность при 630 нм, затем отобрали неприкрепившиеся клетки, а биопленки окрасили кристаллическим фиолетовым. Результаты экспериментов говорят о том, что значительного влияния на рост бактерий исследованные вещества не оказывают. При этом D-галактуриновая кислота существенно снижала эффективность формирования биопленок диким штаммом кишечной палочки, тогда как эффект на пробиотический штамм был противоположным. Этот результат согласуется с оценкой влияния комбинации D-галактурионата и D-маннозы на микробиом гусениц большой восковой моли, проведенной нашими коллегами – оказалось, что эта комбинация увеличивает процентное содержание пробиотических штаммов бактерий (включая лактобацилл), снижая содержание нежелательных штаммов.

Таким образом, результатом нашей работы является список веществ, которые, могут быть эффективны для борьбы с бактериальными биопленками. Также, основываясь на экспериментальных данных, мы смогли сделать вывод, что бактерия штамма *E. coli* K-12 MG1655 образует биопленки эффективнее пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917. Впервые было обнаружено, что D-галактуроновая кислота замедляет образование биопленок *E. coli* K-12 MG1655 эффективнее чем D-манноза, не подавляя образование биопленок *E. coli* Nissle 1917, а также не замедляя скорость роста бактериальных культур. Основываясь на данном факте, можно предположить, что D-галактуроновая кислота может эффективно использоваться как дополнение к D-маннозе в борьбе со штаммами, способными к созданию биопленок.

Авторы выражают благодарность О.О. Бочкаревой из IST Austria за предоставленные геномы EPEC, а также А. Шатровой, И. Ларичевой, А. Ахалкаци и И.Н. Белоусовой за помощь в проведении исследования.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА САХАРОЗОСИНТАЗЫ *SUS4/SS16* У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ КЛУБНЕЙ

Кулакова А.В.

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии
РАН, Москва, Россия

kulakova_97@mail.ru

Клубень картофеля *Solanum tuberosum* L. – запасающий орган растения, в который транспортируются растворимые сахара из фотосинтезирующих тканей для биосинтеза одного из таких важных соединений, как крахмал. Углеводный состав клубней представляет собой комплексный признак, контролируемый как внешними (температура и др.), так и внутренними (генетическими) факторами. Метаболизм углеводов особенно интересен с точки зрения устойчивости клубней к холодовому осахариванию, которое является следствием их хранения при низких положительных температурах. Чувствительность клубней к холодовому осахариванию сопровождается деградацией крахмала и сахарозы с образованием редуцирующих сахаров – гексоз глюкозы и фруктозы. Важно отметить, что регуляция метаболизма крахмала и сахарозы напрямую взаимосвязана и в то же время конкурентна, так как УДФ-глюкоза является общим субстратом данных процессов.

Сахарозосинтаза является ключевым ферментом углеводного метаболизма и контролирует включение сахарозы в различные клеточные процессы. Изоформы фермента расщепляют сахарозу в гетеротрофных органах и кодируются генами семейства *SUS*. В настоящий момент у картофеля известны два гена сахарозосинтазы. Считается, что основным геном, экспрессия которого специфична для клубней, является ген *SUS4/SS16*.

Определяющий основную питательную ценность клубней, крахмал является уязвимым звеном при воздействии низких температур в процессе хранения: активируются сахарозолитические ферменты, повышая устойчивость растений к холоду за счет распада крахмала и накопления редуцирующих сахаров.

В данной работе был проведен биохимический и экспрессионный анализ клубней пяти сортов картофеля (Барин, Утро, Красавчик, Надежда, Северное сияние) в динамике длительного (9 месяцев) низкотемпературного (+3°C) хранения.

В результате было показано, что анализируемые образцы различаются по содержанию крахмала, сахарозы и редуцирующих сахаров (глюкоза, фруктоза) уже в момент сбора урожая (сентябрь). Далее, при длительном воздействии низких температур (период сентябрь – февраль – апрель) содержание крахмала в клубнях постепенно снижается в разной степени у всех сортов, в то время как содержание редуцирующих сахаров растет, но только в случае сортов Надежда и Утро. Для других трех сортов (Красавчик, Барин и Северное сияние) с сентября по февраль было характерно повышение содержания редуцирующих сахаров, в то время как с февраля по апрель содержание гексоз либо не менялось (Красавчик), либо снижалось (Барин, Северное сияние).

Проведенный анализ экспрессии гена *SUS4/SS16* в точках хранения «сентябрь», «февраль» и «апрель» показал сходный паттерн (как по уровню транскриптов, так и по динамике) только для трех сортов (Барин, Утро, Надежда). В сравнении с ними сорт Северное сияние отличался высоким уровнем транскриптов *SUS4/SS16* в сентябре, отсутствием изменений уровня в феврале (vs. сентябрь), а также более низким уровнем транскриптов в апреле, несмотря на то, что с февраля по апрель, как и у других сортов, наблюдался резкий рост экспрессии гена. Интересно, что у сорта Красавчик активность гена *SUS4/SS16* не изменялась.

Предполагается, что такая динамика, как экспрессии гена, так и накопления гексоз, (особенно в период февраль-апрель) может быть связана не только с реакцией клубней на холод, но и с выходом клубней из состояния физиологического покоя (прорастание).

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ КЕРАТИНАЗЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОСМЕТОЛОГИИ

**Лепехина О.В., Рябова А.С., Арзуманова А.Р., Бунеева Е.А., Попович С.А.,
Толкачева А.А., Корнеева О.С., Черенков Д.А.**

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

ol.lepexina2016@yandex.ru

Препараты кератиназы находят широкое применение в медицине и в косметологии – для удаления мертвых клеток кожи, ускорения регенерации и восстановления эластичности, для лечения ряда заболеваний кожи, в том числе при лечении болезней, связанных с нарушением обмена белков и углеводов. Актуальной задачей современной биотехнологии является получение рекомбинантных кератиназ и создание на их основе высокоочищенных препаратов доступных для применения в медицине и в косметологии.

Нами был проведен анализ баз данных биотехнологической информации, а также литературных данных, на основании которого показано, что в качестве источников гена для производства рекомбинантных кератиназ наибольшим потенциалом среди микроорганизмов обладают бактерии родов *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, грибы *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*.

По результатам сравнительного анализа свойств кератиназ из различных микроорганизмов качестве источника гена для создания рекомбинантного продуцента нами были выбраны бактерии *B. licheniformis*, которые обладают высокой кератинолитической активностью. В качестве основы для генетической конструкции использовали плазмидный вектор PET-30b (Novagen). В качестве продуцента были выбраны бактерии *E. coli BL-21*. В целях изучения процесса ферментативного гидролиза кератина с помощью получаемого фермента нами получен модельный субстрат (кератин из куриного пера), проведен анализ его состава и свойств. В настоящее время проводится отработка процесса эффективной экспрессии полученной кератиназы с целью изучения ее физико-химических свойств и дальнейшей разработки технологии выделения и очистки в рамках получения готового ферментного препарата.

ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СУМОИЛИРОВАНИЯ МЕТИЛ-ДНК СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА KAISO И ТРАНСКРИПЦИОННОГО КОРЕПРЕССОРА TRIM28

Лобанова Я.В., Женило С.В.

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии
РАН, Москва, Россия

yaraloban@yandex.ru

Посттрансляционные модификации могут значительно изменять активность транскрипционных факторов, влияя на их конформацию, клеточную локализацию, взаимодействие с кофакторами и ДНК. Одной из таких модификаций является сумоилирование белков, которое аналогично убиквитинированию за исключением того, что оно обычно не приводит к деградации белков.

Kaiso является метил-ДНК связывающим фактором, играющим важную роль в ряде нормальных и патологических процессов: от регуляции клеточного цикла до развития злокачественных новообразований. Ранее было показано, что сумоилирование Kaiso может переключать его транскрипционную активность, однако факторы, вовлеченные в этот процесс, до сих пор не были определены. В данной работе мы показали, что E3 SUMO убиквитин лигаза TRIM28 напрямую взаимодействует с Kaiso и значительно усиливает его сумоилирование, тем самым снижая активность Kaiso в качестве метил-зависимого транскрипционного репрессора. Также было продемонстрировано, что сумоилирование TRIM28 в свою очередь существенно усиливается в присутствии Kaiso, чего нельзя было сказать о влиянии на модификацию TRIM28 ZBTB4, ближайшего гомолога Kaiso. Кроме того, были определены домены Kaiso и TRIM28, участвующие в их взаимодействии.

TRIM28 является не только E3 лигазой, но и выступает в качестве структурного белка, который формирует корепрессионный комплекс с ДНК метилтрансферазами, гистондеацетилазами. Такой комплекс связывается с ДНК за счет взаимодействия с метил-ДНК связывающими белками семейства KRAB в импринтированных участках и на участках ДНК, содержащих транспозоны. Мы предположили, что Kaiso может играть роль в привлечении TRIM28 к ДНК. При удалении Kaiso в клетках светлоклеточного рака человека Saki1 количество белка TRIM28, связанного с хроматином, снижалось.

Таким образом, мы показали, что в регуляцию сумоилирования Kaiso вовлечена E3 SUMO лигаза TRIM28, причем коэкспрессия Kaiso и TRIM28 приводит к гиперсумоилированию TRIM28, что позволяет рассматривать Kaiso в качестве потенциальной E3 SUMO лигазы. Исходя из наших данных, взаимодействие TRIM28 и Kaiso может иметь значение не только для их посттрансляционных модификаций, но и для регуляции привлечения TRIM28 на хроматин.

Работа поддержана грантом РФФ № 19-74-3002.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К СПАРСОМИЦИНУ У ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Логунов С.Е.^{1,2}, Чекмарев И.Д.³, Марьясина С.С.¹, Донцова О.А.¹, Сергиев П.В.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²РХТУ имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³Школа имени Маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия

stepa.2003@bk.ru

Спарсомицин — бактериостатический антибиотик, продуцируемый *Streptomyces sparsogenes*, обратимо ингибирующий связывание тРНК с А-сайтом большой субъединицы рибосомы [1]. Спарсомицин взаимодействует с бактериальной и эукариотической рибосомой [2]. Предполагалось использовать спарсомицин в качестве противоопухолевого агента, однако обнаружилось, что он вызывает ретинопатию. Тем не менее, производные спарсомицина могут представлять клинический интерес [3].

С помощью библиотеки лентивирусов Brunello создана библиотека нокаутных клеток линии Nap1 по 19114 генам. После инкубации со спарсомицином проведено высокопроизводительное секвенирование генов выживших клеток. В результате обнаружен ряд генов, потенциально влияющих на устойчивость к спарсомицину. Для подтверждения их участия в формировании резистентности методом CRISPR/CAS9 получены стабильные клеточные линии, нокаутные по какому-либо из обнаруженных генов. Для этого получены четыре конструкции на основе вектора рх458, кодирующие геновые РНК, нацеленных на определённый ген, и трансфецированы в клетки. Полученные в результате моноклональные культуры генотипировали секвенированием.

При обработке спарсомицином выживают клетки, нокаутные по генам *SMARCA4*, *ELF2*, *WDR48*, *ASH2L*. *SMARCA4* отвечает за регуляцию транскрипции путем ремоделирования хроматина, *WDR48* активирует деубиквентинирующую способность убиквентин-специфичной пептидазы 1, *ELF2* регулирует активность транскрипционного фактора RUNX1, а *ASH2L* обеспечивает третье метилирование гистона H3. Обнаруженные гены кодируют белки, участвующие в регуляции транскрипции, но, по-видимому, они участвуют также в выработке резистентности к спарсомицину.

Для изучения резистентности к спарсомицину получены клетки, нокаутные по этим генам. Подготовлено 2 линии, нокаутные линии по *SMARCA4*, 3 — по *ELF2* и 2 — по *WDR48*.

Литература.

1. Moazed D., Noller H. F. Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – Т. 88. – №. 9. – С. 3725-3728.
2. Lazaro E. et al. A Sarsomycin-resistant Mutant of Halobacterium Salinarium Lacks a Modification at Nucleotide U2603 in the Peptidyl Transferase Centre of 23S rRNA //J. Mol. Biol. – 1996. – Т. 264. – С. 839.
3. Lazaro E. et al. Interaction of the antibiotic sparsomycin with the ribosome //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1991. – Т. 35. – №. 1. – С. 10-13.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕТЕЙ КО-ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Максимова К.А., Власенкова Р.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

KsAMaksimova@stud.kpfu.ru

Болезнь Паркинсона представляет собой хроническое заболевание, при котором происходит гибель дофаминергических нейронов чёрной субстанции, среднего мозга и других отделов центральной нервной системы, что приводит к нарушению моторных и когнитивных функций человека. Одной из важнейших причин развития болезни Паркинсона является наследственность, поэтому изучение генетических факторов важно для понимания патогенеза заболевания.

Для исследования было отобрано 146 генов-маркеров болезни Паркинсона, в том числе гены, имеющие ведущее значение в развитии паркинсонизма: PARK1, кодирующий белок α -синуклеин, GBA, мутации в котором приводят к нарушению лизосомальной аутофагии, PINK1, играющий важную роль в митохондриальном биогенезе, PARK7, влияющий на поддержание целостности дофаминергических нейронов, LRRK2, мутации в котором приводят к усилению киназной активности белка дардарина, что влечёт за собой фрагментацию митохондрий, в том числе неповреждённых. Были использованы данные транскриптома дофаминергических нейронов от 3 здоровых людей и 3 людей, имеющих болезнь Паркинсона.

На первом этапе работы был произведён расчёт коэффициентов корреляции Спирмена по данным экспрессии 146 генов-маркеров болезни Паркинсона и построены коррелограммы отдельно по образцам здоровых людей и людей, имеющих болезнь Паркинсона. Затем по значениям корреляции были построены взвешенные сети ко-экспрессии. С помощью метода анализа взвешенных сетей ко-экспрессии (WGCNA) были выявлены крупнейшие модули, а также найдены центральные гены в каждой из сетей. Завершающим этапом стало проведение агломеративной иерархической кластеризации (AGNES), построение дендрограмм и их сравнение.

Таким образом, в результате сравнительного анализа сетей ко-экспрессии маркеров болезни Паркинсона, было получено значение кофенетической корреляции между дендрограммами здоровых людей и пациентов, равное 0,5775892, что показывает значительное различие в паттернах экспрессии генов-маркеров у здоровых людей и людей, имеющих болезнь Паркинсона.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

МУТАЦИИ K141E И K137E В БЕЛКЕ HSPB8 ЧЕЛОВЕКА ОГРАНИЧИВАЮТ ЕГО КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ

Мартынов Д.Д., Петров Я.С., Акберова Н.И.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

DDMartynov@stud.kpfu.ru, YSPetrov@stud.kpfu.ru

Малый белок теплового шока 8 (HspB8) относится к семейству малых белков теплового шока и играет важную роль в ответной реакции организма на различные стрессы, митотическом делении клеток и клеточной аутофагии. Так, HspB8 совместно с белком BAG3 (Bcl-2-ассоциированный атаноген 3) участвует в активации процесса селективной аутофагии с помощью шаперонов, способствуя приобретению клеточной устойчивости к ингибиторам протеасом. Миссенс – мутации в положениях 141 HspB8 связывают с развитием болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа. Пространственная структура HspB8 была ранее предсказана нами с помощью алгоритма TrRosetta. Целью данной работы был анализ и сравнение динамических свойств HspB8 дикого типа (HspB8 WT) с его мутантными формами HspB8 K141E и K137E с помощью метода молекулярной динамики.

Мутантные формы HSPB8 K141E и K137E были получены с помощью сервиса Robetta путем предсказания структуры мутантов по измененной аминокислотной последовательности белка и шаблону структуры белка дикого типа. Для полученных траекторий были рассчитаны и проанализированы среднеквадратичное отклонение атомов (RMSD), среднеквадратичная флуктуация атомов (RMSF), изменения вторичной структуры белка, потенциальная и общая энергии системы, электростатические, водородные и гидрофобные взаимодействия, поверхность доступная для растворителя (SASA), изменение радиуса гирации (Rg), проведен анализ главных компонент (PCA). Для визуализации полученных результатов использовали программы VMD и PyMol. Равновесную молекулярную динамику проводили в программе NAMD с использованием силового поля CHARMM36m, в явном растворителе, ионы NaCl добавляли в концентрации 0,15M, использовали модель воды TIP3. Общее время каждой симуляции составило 100 нс.

На основании PCA анализа траекторий установлено сближение и отдаление альфа-кристаллинового ACD и N доменов HSPB8 WT, что может указывать на наличие двух состояний белка, при этом задействована шарнирная область, состоящая из 3 пролинов (PRO88/89/90). PCA мутантных форм указывает на менее значительные изменения положения ACD и N доменов. Распределение изменения радиуса гирации Rg структуры HSPB8 WT имеют 2 пика в 19,5 Å и 23 Å, вероятно, соответствующих «открытому» и «закрытому» состоянию белка. Кривые распределения Rg мутантов унимодальны со значениями в 19,75 Å и 20 Å для K141E и K137E соответственно, что может говорить о преимуществе закрытых состояний. Пиковые значения кривых распределения SASA составляют 1430 Å², 1400 Å² и 1370 Å² для WT, K137E и K141E соответственно, таким образом, SASA белка дикого типа и мутантных форм не отличаются.

Проведенный сравнительный анализ траекторий молекулярной динамики HspB8 дикого типа и его мутантных форм K141E и K137E показал, что эти мутации ограничивают переход структуры белка в «открытую» некомпактную форму.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ ПУТИ ОКИСЛЕНИЯ МАННИТА У МЕТИЛОТРОФА *METHYLOBREVIS PAMUKKALENSIS* PK2

Мельников О.И., Розова О.Н.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

oleg96mel@gmail.com

Факультативный метилотроф *Methylobrevis pamukkalensis* PK2 является представителем нового семейства *Pleomorphomonadaceae* класса *Alphaproteobacteria*. Данный микроорганизм является интересным объектом для изучения благодаря своей способности расти не только на метаноле, но и на С6 сахарном спирте манните и ряде простых сахаров. *M. pamukkalensis*, как и все известные на данный момент метилотрофы класса *Alphaproteobacteria*, использует сериновый путь С1 ассимиляции. Анализ генома *Mb. pamukkalensis* PK2 выявил небольшой кластер, включающий в себя гены транспортной системы маннита и маннит-2-дегидрогеназы (МТД), предположительно обеспечивающий ферментативную основу окисления маннита до фруктозы. Затем фруктоза фосфорилируется до фруктозо-6-фосфата фруктокиназой (ФРК). Дальнейший же распад С6 фосфосахаров происходит по пути Энтнера-Дудорова (*Poroshina et al.*, 2015).

В ходе работы были получены гомогенные белковые препараты рекомбинантных МТД и ФРК. МТД катализирует обратимое окисление маннита до фруктозы с восстановлением НАД⁺ до НАДН. Фермент является мономером с молекулярной массой 53 кДа и относится к семейству длинноцепочечных дегидрогеназ. Максимальная активность МТД составила 136 Е/мг белка. Рабочий диапазон рН фермента в сторону образования фруктозы от 8 до 11 с оптимумом рН 10,5, однако в обратную сторону фермент работает в диапазоне от 6 до 9 с оптимумом рН 7,5. Температурный оптимум составил 50°C. МТД – термостабильна, выдерживает нагрев до 50°C без потери активности в течение 60 минут. При оптимальном рН и 30°C значение К_м для маннита составило (0,24 ± 0,027) мМ, для НАД⁺ – (0,035 ± 0,002) мМ, для фруктозы – (16,33 ± 3,01) мМ, для НАДН – (0,007 ± 0,001) мМ. Фосфоенолпируват в концентрации 1 мМ выступает в качестве умеренного ингибитора МТД, снижая её активность на 30%. С другой стороны, сукцинат, гидроксипируват, глюкоза-1,6-бисфосфат, АДФ, фумарат, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, глюкоза-6-фосфат и АМФ увеличивали активность фермента на 30 – 50 %.

ФРК катализирует последующее фосфорилирование фруктозы до фруктозо-6-фосфата за счет энергии АТФ. Рабочий диапазон рН фермента от 7 до 10 с оптимумом рН 9,5. Температурный оптимум составил 60°C. Интермедиаты метаболизма не оказывают явного влияния на работу ФРК, однако двухвалентные ионы Cu²⁺ и Zn²⁺ в концентрации 1 мМ полностью ингибируют активность фермента.

Выращивание *Mb. pamukkalensis* PK2 одновременно на метаноле и манните показало, что пути утилизации обоих субстратов функционируют параллельно и с относительно схожей эффективностью, о чем свидетельствуют данные скорости и объема использования субстратов относительно показателей роста культуры. Таким образом, можно говорить о полной независимости путей окисления и ассимиляции маннита и метанола. Однако активность МДГ отсутствовала в бесклеточных экстрактах клеток, выращенных на метаноле, что указывает на индуцибельность данного пути.

С помощью гена контрселекции *sacB* был получен безмаркерный делеционный штамм по 4 генам, кодирующим белки транспортной системы маннита. Данный штамм был не способен расти на манните. Следовательно, маннит проникает в клетки *Mb. ramukkalensis* за счет строго специфичной транспортной системы ABC типа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00357.

СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Мыскова А.В., Ганчева М.С., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

nanateiubesc@gmail.com

Конструкции вида «промотор гена интереса – репортер» широко используются в генетических исследованиях. В качестве репортеров используются гены, за чьей экспрессией легко проследить: например, их продукт ярко окрашен. Будучи под контролем промотора некоего гена, находящегося в исследуемом объекте, репортер экспрессируется согласно тем же паттернам, что и ген интереса. Таким образом, по локализации и интенсивности окраски можно оценить в каких тканях организма экспрессируется ген интереса, а также как на его экспрессии сказывается влияние факторов среды.

Распространенными репортерами являются гены флуоресцентных белков. Каждый такой белок имеет свой спектр излучения. Если верно подобрать комбинацию белков для анализа нескольких факторов, можно одновременно видеть свечение разных цветов, за счет чего определять, в каких клетках локализован тот или иной репортер.

Опираясь на соотношение спектров, для нашей работы мы выбрали гены флуоресцентных белков *mTagBFP*, *mCherry* и *NeonGreen*. Соответственно, итоговая конструкция будет содержать три модуля для анализа активности промоторов. Для работы с растительными клетками мы использовали два синтетических промотора, участвующих в обеспечении чувствительности к фитогормонам цитокининам и ауксинам. В третьем модуле конструкции предусмотрена возможность вставки промотора интереса, – перед геном репортера находится ген *lacZ*, – что позволяет модифицировать вектор под конкретное исследование.

Сборка модулей и их объединение осуществляется с помощью системы плазмидных векторов *MoClo* (*Weber et al.*, 2011). Данная система дает возможность с высокой эффективностью конструировать мультигенные комплексы за счет использования эндонуклеаз рестрикции типа IIS, позволяющих задавать произвольные «липкие концы» фрагментов и тем самым обеспечивать их объединение в необходимом порядке.

На данном этапе работы мы уже подготовили плазмидные векторы, содержащие модули *TCS-mTagBFP-act* (промотор чувствительности к цитокинину, флуоресцентный белок с голубым свечением, терминатор), *DR5-mCherry-t35s* (промотор чувствительности к ауксину, флуоресцентный белок с красным свечением, терминатор), и ген устойчивости к антибиотику гигромицину, необходимый для отбора трансгенных растений, который также будет включен в итоговую конструкцию.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с договором № 075-15-2022-322 от 22.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета Российской Федерации. Грант был предоставлен на государственную поддержку создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

СНИЖЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ И ЦИТОЛИТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТЕЙ ГЕМОЛИЗИНА II В. *CEREUS* И АЛЬФА-ГЕМОЛИЗИНА (Hla)
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ЗА СЧЕТ ОБРАЗОВАНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Нагель А.С.¹, Сиунов А.В.¹, Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Мельник Б.С.², Хлебалина
Н.А.^{1,3}, Иванова Т.Д.^{1,3}, Ветрова О.С.^{3,4}, Джомикова Д.Ш.^{3,4}, Каратовская А.П.⁴,
Замятина А.В.⁴, Руденко Н.В.⁴, Солонин А.С.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

²Институт белка РАН, Пушино, Россия

³Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

⁴Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

anagell@mail.ru

Гемолизин II (HlyII) *Bacillus cereus* и альфа-гемолизин (Hla) *Staphylococcus aureus* – бактериальные бета-склчатые токсины, которые секретируются в виде водорастворимых мономеров и собираются в гептамеры, образуя трансмембранные поры в мембранах эукариотических клеток. Наша цель заключается в использовании дисульфидных связей для анализа конформационных переходов и селективного ограничения цитолитической активности. Согласно прогнозам относительного расположения отдельных аминокислотных остатков, получены двойные мутанты с введением цистеинов: Q178C и V197C для HlyII, а также Q150C и V169C для Hla, расстояние между которыми должно изменяться при переходе из мономерных форм в олигомерные. Природные формы этих поринов не содержат цистеиновых остатков. Мутантные формы HlyII стабильны и часть белка находится в водорастворимой фракции, в то время как Hla обнаруживается в осадке. Цистеиновые мутанты HlyII и Hla обладают сниженной гемолитической активностью, регулируемой восстанавливающими агентами. Значительное снижение цитолитической активности на мышинной модели позволяет получать моноклональные антитела к нативным мономерным формам как HlyII, так и Hla. При анализе мутантов HlyII и Hla в присутствии эритроцитов и в отсутствие дитиотреитола обнаруживаются конформационные перестройки, препятствующие образованию олигомерных форм.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-74-10026.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА ЧЕЛОВЕКА NaPi2b В ПРИСУТСТВИИ И ОТСУТСТВИИ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Назаров А.М., Киямова Р.Г., Власенкова Р.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

artemiy_nazarov@internet.ru

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является перспективной мишенью для таргетного лечения рака яичника, легкого, щитовидной железы и других видов злокачественных новообразований, а также для диагностики и прогнозирования при различных видах рака.

Транспортер NaPi2b имеет несколько трансмембранных доменов, С- и N-концевые домены, расположенные в цитоплазме, и большой внеклеточный домен – ВКД (234-361 а.о.), в составе которого есть 4 цистеина в положениях 303, 321, 328 и 350. Для выявления степени влияния дисульфидных связей 303-322 и 328-350 в ВКД NaPi2b на взаимодействие аминокислот NaPi2b использовалась методика построения сетей аминокислотных взаимодействий. Для этого были использованы данные молекулярной динамики, полученные *in silico*, а именно: консервативность, заряд, гидрофобность, RMSF (root mean square fluctuation) и другие. Исходя из этих параметров была определена формула для вычисления веса аминокислоты по её характеристикам. С использованием этой формулы были построены взвешенные графы для всех вариантов дисульфидных связей внутри ВКД. Из этих графов были получены дендрограммы с использованием метода DIANA (divisive analysis). Для всех дендрограмм была построена матрица корреляции и определены коэффициенты корреляции.

Был проведен сравнительный анализ сетей взаимодействия аминокислот натрий-зависимого фосфатного транспортера человека NaPi2b в присутствии и отсутствии дисульфидных связей, в результате чего были получены следующие коэффициенты корреляции относительно контроля – 0,5513 для связи между 328-350, 0,8786 для связи между 303-322. Таким образом, дисульфидная связь 303-322 влияет сильнее на взаимодействие аминокислот NaPi2b в целом, и аминокислот в ВКД в частности.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF4E ТАБАКА С БЕЛКОМ VPg ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ Y

Никаноркина В.В.¹, Криолло Дельгадо Л.М.², Таранов В.В.¹, Лебедева М.В.¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Москва, Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

vnikanorkina@mail.ru

Y-вирус картофеля (PVY) принадлежит к роду *Potyvirus* семейства *Potyviridae*, крупнейшему семейству РНК-содержащих вирусов, поражающих растения. PVY передается тлями и поражает широкий спектр растений-хозяев семейства *Solanaceae*, включая помидоры, картофель и табак. Геном PVY представляет собой одноцепочечную молекулу РНК длиной около 10000 оснований, полиаденилированной на 3'-конце и ковалентно связанной с вирусным белком VPg (viral genome linked protein) на 5'-конце.

При заражении полноразмерная РНК вирусного генома транслируется в полипротеин, преобразующийся затем в ряд функциональных белков. Завершение вирусного цикла потивирусной инфекции зависит от сложных взаимодействий между факторами, кодируемыми вирусом и хозяином. В случае с PVY ранее в исследованиях было показано, что для инициации трансляции вирусных РНК в клетках необходимо взаимодействие вирусного белка VPg с растительными факторами инициации трансляции семейства eIF4E. Факторы инициации трансляции eIF4E являются важными компонентами, которые кодируются небольшим мультигенным семейством и связываются с экзистированным 5'-концом мРНК. Белок VPg имитирует кэп-структуру мРНК клетки-хозяина, что позволяет начать синтез вирусных белков в растительной клетке. Именно отсутствие взаимодействия между вирусным VPg и растительным eIF4E и его изоформой eIF(iso)4E во многих случаях является основной причиной устойчивости к PVY, при этом для нарушения взаимодействия может быть достаточно единичных аминокислотных замен в факторе инициации трансляции. Поэтому растительные eIF4E/eIF(iso)4Es могут рассматриваться как рецессивные гены устойчивости к потивирусу у различных видов растений. Однако потивирусы могут мутировать, восстанавливая взаимодействие VPg с мутантом-хозяином eIF4E, либо позволяют взаимодействовать с другим членом семейства eIF4E.

Табак является амфидиплоидным растением, унаследовавшим свой геном от *Nicotiana sylvestris* (S-геном) и *Nicotiana tomentosiformis* (T-геном). Из восьми вариантов факторов инициации трансляции eIF4E табака пять получены из генома *N. tomentosiformis* и три из генома *N. sylvestris*. Ранее было установлено, что из восьми факторов семейства eIF4E табака с PVY в основном связывается первый фактор (eIF4E-1), однако вирусом могут рекрутироваться и другие факторы, какие именно из оставшихся семи неизвестно. На данный момент не найдены мутантные варианты фактора eIF4E табака, нарушающие взаимодействие с VPg и при этом не влияющие на функциональность самого фактора eIF4E растения.

Некоторые штаммы вируса Y могут преодолевать устойчивость, что представляет собой серьезную угрозу для производства табака во всем мире, выяснение молекулярной основы их способности преодолевать резистентность является актуальной задачей. Необходимо детально изучить взаимодействие белка VPg вируса картофеля Y с различными факторами инициации трансляции eIF4E табака.

Исследование было выполнено в рамках Государственного задания номер FGUM - 2022-0004.

ОРГАНИЗАЦИЯ 5S рДНК КЛАСТЕРОВ В ГЕНОМЕ ЗЕБРОВОЙ АМАДИНЫ

Панферов Е.В., Такки О.Д., Кулак М.М., Галкина С.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

st064846@student.spbu.ru

Рибосомные РНК (рРНК) – основной структурный и каталитический компонент рибосом, ключевого элемента белок-синтезирующего аппарата клетки. У многих эукариот гены 18S, 5,8S и 28S рРНК находятся на хромосомах в районе ядрышкового организатора (ЯОР), в то время как кластер с копиями генов 5S рРНК обычно расположен за пределами ЯОР в отдельном хромосомном локусе. У птиц этот локус обычно располагается на ортологах хромосомы 9 домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*), однако у зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*) кластер генов 5S рРНК был цитогенетически картирован на длинном плече хромосомы 1. Целью нашей работы было детальное изучение распределения генов 5S рРНК в геноме и на хромосомах зебровой амадины.

Биоинформатическими методами мы показали, что в сборке генома зебровой амадины присутствуют три 5S рДНК кластера, на 2, 4 и 9 хромосомах, отличающиеся между собой числом повторяющихся единиц и последовательностями как самих 5S рРНК генов, так и нетранскрибируемых спейсеров (NTS). Гены и NTS хромосом 2 и 4 идентичны друг другу и отличаются от генов хромосомы 9.

Результаты флуоресцентной гибридизации *in situ* с зондами к разным вариантам последовательностей 5S рДНК с последующей тирамидной амплификацией сигнала подтверждают существование этих трех кластеров – флуоресцентный сигнал обнаруживается на хромосомах TGU1, TGU4 и TGU10, соответствующих 2, 4 и 9 хромосомам в сборке генома. Интересно, что сигнал также обнаруживается и на коротких плечах некоторых акроцентрических микрохромосом. Высокоразрешающее физическое картирование на хромосомах типа ламповых щеток подтверждает присутствие 5S рДНК в периферическом районе микрохромосом, в том числе в составе самых маленьких, состоящих из одного-двух хромомеров. Биоинформатический анализ выявляет единичные 5S-подобные участки только на хромосомах 24 и 35.

Таким образом, подробная аннотация всех 5S рДНК последовательностей в сборке генома зебровой амадины позволила выявить два варианта 5S рДНК повторов, что является первым наблюдением такого рода для птиц. Канонический повтор располагается на TGU10 – ортологе хромосомы 9 курицы, копии другого (более вырожденного) варианта гена обнаруживаются в составе периферического гетерохроматина некоторых хромосом в кариотипе амадины. Остается невыясненным, кодируют ли оба варианта 5S рДНК канонические рРНК, или несут какие-либо другие функции.

Авторы выражают благодарность сотрудникам РЦ «ЦКП Хромас». Работа поддержана грантом РФФИ №22-24-00538.

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОРТОЛОГОВ CRISPR CAS12A

**Потысьева А.С., Арсениев А.Н., Селькова П.А., Васильева А.А., Мельников А.С.,
Сердобинцев П.Ю., Ходорковский М.А.**

Санкт-Петербургский Политехнический университет имени Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

alina.potyseva@yandex.ru

Системы CRISPR/Cas – это своеобразный иммунитет бактерий и архей. Они состоят из гидовой РНК, направляющей эффекторный белок на специфичную последовательность чужеродной ДНК либо РНК, и Cas белков (нуклеаз), расщепляющих мишень. Эти системы делятся на несколько классов, некоторые из которых обладают коллатеральной активностью, заключающейся в неспецифическом разрезании нецелевых однонитевых фрагментов ДНК. Она активизируется только после того, как произошло специфическое разрезание ДНК-мишени. Именно коллатеральная активность CRISPR/Cas систем легла в основу нового типа диагностических систем, позволяющих детектировать как бактериальные, так и вирусные инфекции в полевых условиях.

Целью данной работы стало сравнение параметров коллатеральной активности двух ортологов CRISPR Cas12a: AsCas12a и ScCas12a. Представленные ортологи характеризуются похожими гидовыми РНК и последовательностями PAM: 5'-TTTV-3' для AsCas12a и 5'-YTTN-3' для ScCas12a. Для исследуемых систем были проведены эксперименты, направленные на выявление взаимосвязи между степенью специфичности белков эффекторов и эффективностью коллатерального расщепления однонитевых ДНК. В рамках данной работы были сконструированы ДНК мишени, содержащие одиночные замены в области PAM, фланкирующей последовательность протоспейсера. На первом этапе была охарактеризована специфическая нуклеазная активность AsCas12a и ScCas12a. Далее методом спектрофлуориметрии детектировалась динамика коллатеральной активности белков. Визуализация производилась с помощью специальных зондов с различными флуоресцентными метками. Полученные данные свидетельствуют о большей специфичности белка ScCas12a. Замены во 2 и 3 позициях в последовательности PAM ДНК мишени для ScCas12a приводили к значительному ингибированию коллатеральной активности белка эффектора, в то время как на белок AsCas12a эти замены оказывали меньшее влияние.

В результате данной работы было показано, что система ScCas12a сильнее реагирует на замены в последовательности PAM, что означает, что она может быть использована для диагностики даже одиночных мутаций. Полученные данные чрезвычайно актуальны для разработки систем детекции мутантных штаммов инфекции.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФфуЗИОННЫХ ОГРАНИЧЕНИЙ РЕАКЦИЙ В БИОСЕНСОРАХ, ОСНОВАННЫХ НА ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫХ НЕТКАНЫХ МЕМБРАНАХ

Прусаков К.А.^{1,2}, Сидорова А.Е.², Маслакова А.А.², Павлова Е.Р.¹, Багров Д.В.^{1,2}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика
Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

²Биологический факультет Московского государственного университета имени
М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kaprusakov@gmail.com

Для биосенсоров и аналитических методик, в основе которых лежит сборка молекулярного сэндвича на твердой поверхности, диффузия часто является лимитирующим фактором, ограничивающим чувствительность и быстродействие. Это ограничение усугубляется, когда реакции связывания происходят на внутренних поверхностях пористого материала. С одной стороны, пористые мембраны характеризуются большим соотношением площади поверхности к объёму и могут предоставить большее количество сайтов связывания, чем плоские поверхности. Считается, что эти свойства должны способствовать улавливанию из пробы большего количества молекул аналита, и улучшать характеристики биосенсора. Однако, с другой стороны, без принятия дополнительных мер, развитая пространственная структура пористой мембраны затрудняет доступ молекул аналита к некоторым сайтам связывания. Для плоских поверхностей (доньшко планшета, покровное стекло и т.п.) диффузионные ограничения могут быть снижены с помощью перемешивания растворов, а для пористых материалов необходима принудительная прокачка растворов через поры.

Приведенные рассуждения были проверены нами теоретически и экспериментально. В эксперименте использовали биосенсор, основанный на нетканых мембранах, изготовленных методом электроформования (электроспиннинга). Мембраны были изготовлены из полидиоксанона, они состояли из волокон с диаметрами в диапазоне 100 нм – 1 мкм.

Для оценки диффузионных ограничений в такой системе были проведены сравнительные теоретические расчёты и модельные эксперименты, причем контакт растворов и мембраны осуществляли одним из двух способов. В первом случае мембрана инкубируется в растворе с перемешиванием, но без активной прокачки, что означает, что молекулы аналита могут попадать в толщу мембраны только за счет диффузии. Во втором случае происходит циклическое пропускание раствора аналита через мембрану. При таком способе жидкость внутри мембраны интенсивно обновляется, поэтому можно предположить, что в каждый момент времени концентрация молекул аналита одинакова во всём внутреннем объеме мембраны. Следовательно, реакция связывания будет протекать во всём объеме мембраны с одинаковой скоростью, и все участки мембраны достигнут равновесия практически одновременно. В теоретической части работы было проведено сравнение нескольких моделей, описывающих данные способы инкубации. В экспериментальной части работы с использованием электроформованных мембран из полидиоксанона было показано, что при одинаковом времени инкубации принудительная прокачка обеспечивает в 2-3.5 раза более интенсивную адсорбцию аналита на мембрану, чем свободная диффузия.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект №21-74-10042.

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНОГО ШТАММА *RHODOCOCCLUS QINGSHENGII* X5 С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА *ALKB1*

Режепова А.А.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.², Петриков К.В.²

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

liregepova@gmail.com

Rhodococcus qingshengii X5 охарактеризован как эффективный деструктор ряда n-алканов, в том числе и при низких положительных температурах. Известно, что геном штамма *R. qingshengii* X5 содержит несколько копий *alkB* гена, которые кодируют алканмонооксигеназы, отвечающие за деградацию углеводородов нефти. Однако до сих пор не выяснена роль такого количества генов этого типа в клеточном метаболизме.

Для выявления возможной роли гена была поставлена цель – получить мутантный штамм *R. qingshengii* X5 с делецией гена *alkB1* в геноме с помощью конъюгации для дальнейшего сравнения с исходным диким штаммом. В качестве вектора, несущего мутантный аллель, была выбрана конъюгативная плаزمида pJQ200KSΔ*alkB1*, содержащая селективный маркер в виде устойчивости к гентамицину и контрселективный маркер (чувствительность к сахарозе, *sacB*). Ген *sacB* кодирует левансуказу, синтезирующую из сахарозы леван, являющийся токсичным. В качестве конъюгативных штаммов-доноров были выбраны штаммы рода *Escherichia coli* – BW19851 и S17-1. Ранее были подобраны наиболее эффективные методы получения компетентных клеток и последующей их трансформации.

Нужный нам вектор переносили путем конъюгации из штаммов *E. coli* в *R. qingshengii* X5, что показало большую эффективность, чем электропорация.

Конъюгация была поставлена с сахарозочувствительными клонами *E. coli* BW19851 и S17-1, содержащих плазмиду pJQ200KSΔ*alkB1*, и *R. qingshengii* X5. Трансконъюганты *R. qingshengii* X5 были отобраны после четырех суток роста на агаризованной среде Lysogeny broth (LB) при 28°C.

На первом этапе рекомбинации были получены 27 клонов, устойчивых к гентамицину, из которых 20 оказались меродиплоидами (у 19 клонов вставка прошла по правому плечу, а у одного – по левому). Для дальнейшей работы были выбраны два меродиплоида *R. qingshengii* X5 со вставкой по каждому из плеч. На втором этапе были выделены немаркированные мутанты непосредственно с помощью контрселекции, опосредованной сахарозой, на агаризованной среде LB без хлорида натрия с добавлением сахарозы в концентрациях 10 г/л и 20 г/л при двух температурах инкубирования – 20 и 28°C. В конечном счете было получено 10 мутантов *R. qingshengii* X5 с делецией гена *alkB1*, которые также были проверены на чувствительность к гентамицину.

Клоны *R. qingshengii* X5, продемонстрировавшие мутантный генотип в результате ПЦР-анализа, были отсекуены.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ISSR-МАРКЕРОВ НА РЕЗУЛЬТАТ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ

Ржевский С.Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и
биотехнологии, Воронеж, Россия

slavaosin@yandex.ru

Одним из распространенных методов генотипирования является использование межмикросателлиных (ISSR) маркеров, обладающих широкой специфичностью (одни и те же наборы праймеров можно использовать для анализа разных видов). Его недостатком является высокая чувствительность к изменению параметров ПЦР. Целью данной работы было исследование влияния концентрации ISSR праймеров в реакционной смеси на результат ПЦР-амплификации, проведенное на наборе шести ISSR маркеров, амплифицируемых на ДНК клена серебристого (*Acer saccharinum* L.), для оценки перспективности применения данного метода в генетической паспортизации деревьев.

Экстракция ДНК осуществлялась из листьев модифицированным ЦТАБ-методом. В исследовании были задействованы шесть ISSR-маркеров (UBC_807, UBC_815, UBC_822, UBC_823, UBC_824, UBC_866). В ПЦР смесь с одним и тем же образцом ДНК добавлялись праймеры в четырех вариантах объема (см. таблицу). Продукты ПЦР разделялись посредством электрофореза в 2 % агарозном геле в течение 80 мин при напряжении 80 В.

В результате проведенного анализа установлено, что для четырех из шести исследуемых праймеров изменение концентрации существенно повлияло на результат амплификации (таблица 1).

Таблица 1. Влияние концентрации праймеров на результаты амплификации (в столбцах указано количество полученных ампликонов для каждого образца)

Праймер/объем	0,5 мкл	1 мкл	1,5 мкл	2 мкл
UBC_807	4	3	2	2
UBC_815	5	1	3	1
UBC_822	1	1	1	1
UBC_823	1	1	1	1
UBC_824	2	2	1	2
UBC_866	3	5	5	6

Ранее проведенные автором исследования показали, что на амплификацию ISSR праймеров также существенно влияют температуры отжига и длительность времени отжига. Таким образом, результаты ISSR анализа существенно зависят от условий его проведения, что не обещает высокой повторяемости. Данный метод мало пригоден для составления индивидуальных генетических паспортов, однако может быть использован в определении генетического сходства различных клонов и видов, при условии, что образцы анализируются одной партией, ПЦР проводится в идентичных условиях, и равенство концентрации компонентов ПЦР-смеси строго соблюдается.

Данная работа проведена в рамках госзадания по теме НИР «Разработка технологии *in vitro* выращивания селекционно-улучшенного материала клена и липы».

ИССЛЕДОВАНИЕ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОЖИВЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦА КИШЕЧНОГО СОДЕРЖИМОГО ИСКОПАЕМОГО БИЗОНА

Рудина Ю.В.¹, Кольжецов Н.П.², Шавкунов К.С.², Озолинь О.Н.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия.

alice-43@yandex.ru

Исследование древних микроорганизмов и их сообществ является актуальной задачей, поскольку позволяет осуществлять поиск новых, потенциально полезных, штаммов, а также проводить проверку эволюционных гипотез. Одним из источников для получения таких сообществ могут служить останки ископаемых животных. Представляемая работа заключалась в оживлении сообщества тонкого кишечника ископаемого бизона *Bison priscus*, возрастом приблизительно 50 000 лет.

Фрагмент тонкого кишечника ископаемого бизона вместе с пристеночным содержимым помещали в жидкую R2A, перемешивали и инкубировали 30 минут. После этого 1 мл суспензии вносили в пробирки Хангейта и растили в течение суток. Полученные культуры концентрировали и выделяли ДНК при помощи PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. Секвенирование проводили на платформе MinION Oxford Nanopore Technologies. Сборку делали при помощи metaFlye. Этап полишинга проводили при помощи Raco. Полученные контиги классифицировали алгоритмом Kraken2. Прочтения классифицировали тем же алгоритмом для оценки количественного соотношения видов в образце. Результаты классификации визуализировали с помощью Krona. Контиги разных микроорганизмов отделяли друг от друга на основании классификации и аннотировали при помощи Prokka. Поиск гомологичных последовательностей проводили алгоритмом Blast. Филогенетические деревья строили при помощи метода максимального правдоподобия в программе Megal1.

Удалось получить культуру анаэробных организмов, обладающих способностью к активному газообразованию. Классификация сборки указывает на принадлежность контигов следующим видам: *Clostridium sordellii*, *C. perfringens*, *C. bifermentas*, *C. difficile*, *C. novyi*, *Bacillus cereus*. Классификация прочтений указывает на доминирование *C. sordellii*. Геном этого вида вместе с геномом *C. perfringens* был выбран для аннотирования и филогенетического анализа.

Деревья, построенные на основе последовательностей белков (α -toxin, фосфолипаза C, tetM для *C. Sordellii*; α -toxin, LnrL, RTX-I binding protein для *C. perfringens*), в целом подтверждают принадлежность исследуемых геномов к указанным классификационным алгоритмом видам. Это дополнительно проверено полногеномным выравниванием: геном исследуемой *C. sordellii* показывает достаточно высокое сходство с геномом *Paeniclostridium sordellii strain AM370*, а *C. perfringens* – с *C. perfringens strain CPI 18-6*.

Проведенный первичный анализ открывает перспективы для дальнейших исследований данных штаммов и подбора новых методов культивирования, направленных на получение иных композиций оживленного сообщества.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СЫРЬЯ

**Рябова А.С., Арзуманова А.Р., Бунеева Е.А., Попович С.А., Лепехина О.В.,
Толкачева А.А., Черенков Д.А., Корнеева О.С.**

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

ryaba.16@mail.ru

Гиалуроновая кислота – гликозаминогликан, входящий в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей. Она является одним из компонентов внеклеточного матрикса и содержится в биологических жидкостях. Большая часть гиалуроновой кислоты вырабатывается в молекулах ткани суставных хрящей, глазного яблока, кожи и т.д. В связи с этим препарат гиалуроновой кислоты используется в медицине, в том числе в косметологии для поддержки водного баланса тканей организма. Проблемой промышленного получения гиалуроновой кислоты является низкая доступность животного сырья и наличие в конечном продукте недопустимых примесей, вызывающих аллергические и воспалительные реакции, а также возможность заражения продукта вирусами животного происхождения.

Целью нашего исследования является разработка технологии получения и проведение качественного и количественного анализа препаратов гиалуроновой кислоты из различных источников: отходов животноводства (стекловидного тела глаза крупного рогатого скота, куриных гребешков) и микробиологического сырья, полученного биотехнологическим способом. Разработка технологии получения доступной и безопасной для потребителей гиалуроновой кислоты представляет интерес в прикладной науке, в том числе биотехнологии и медицине, а также является перспективным направлением коммерциализации научных исследований в этой области.

Ключевыми особенностями разрабатываемой технологии являются применение методов тонкой очистки: ультрафильтрации, диализа и хроматографии, а также метода лиофильной сушки для максимального сохранения нативной структуры получаемого продукта. Для контроля качества полученного продукта из животного сырья нами также будет использован метод ПЦР с целью исключения заражения вирусами. В настоящее время нами осуществлен подбор источников сырья, получены лабораторные препараты гиалуроновой кислоты, проанализированы их физические и химические свойства, в том числе методом инфракрасной спектроскопии. Проведено сравнение потребительских свойств жидкой и лиофилизированной формы конечного продукта. Сравнительное изучение свойств гиалуроновой кислоты, полученной из различных источников, позволит выбрать и оптимизировать технологию получения препаратов гиалуроновой кислоты для дальнейшего практического применения.

ОЦЕНКА ХЕЛАТИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ВЫСОКО АФФИННОГО ТРАНСПОРТЕРА МЕДИ 1 ЧЕЛОВЕКА (NDCTR1)

Самусева П.Д.^{1,2}, Щукина А.Д.¹, Мехова А.А.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский Политехнический университет имени Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

samusevap@yandex.ru

Медь (Cu) – каталитический и структурный кофактор жизненно важных купроэнзимов. Нарушения работы АТР7В, Cu-транспортной АТФазы, вызванные мутациями в гене *АТР7В*, приводят к развитию болезни Вильсона (БВ), которая характеризуется накоплением токсической меди в организме. Для снижения концентрации Cu используют разрешенные FAD хелаторы, которые, однако, обладают тяжелыми побочными эффектами. Поэтому для лечения БВ являются актуальными поиск и характеристика альтернативных лекарственных средств.

В работе в качестве модели использовали штамм *C. elegans*, несущий H828Q аминокислотную замену CUA-1, гомологичную АТР7В. Замена H828Q аналогична замене H1069Q в АТФ-связывающем сайте АТР7В, приводящей к развитию БВ и самой распространенной в Европейской популяции. В качестве хелатора Cu тестировали рекомбинантный NdCTR1. Оценивали его способность хелатировать серебро (Ag), так как ионы Ag(I), изоэлектронны Cu(I), поэтому переносятся Cu-транспортными. Нематоды получали NdCTR1, питаясь бактериями *E. coli* штамма BL21, продуцирующими рекомбинантный белок, включающий В1 домен иммуноглобулин-связывающего белка G стрептококка (GB1) и NdCTR1. Для изучения развития нематод, получающих различные штаммы бактерий, животных инкубировали на чашках Петри со средой NGM в течение 56 часов, затем подсчитывали количество особей, достигших стадии L4. Для поиска LD₅₀ Ag в среду NGM добавляли AgNO₃ (0, 50, 100 мкг/мл для штамма N2 и 0, 1, 2 мкг/мл для штамма H828Q) и инкубировали *C. elegans* в течение 3 суток, после чего подсчитывали количество выживших особей. При оценке способности NdCTR1 хелатировать Ag нематод, получающих различные штаммы бактерий, инкубировали в среде с полученными LD₅₀ Ag в течение 3 суток, затем подсчитывали количество выживших особей. В начале всех экспериментов нематод синхронизировали на эмбриональной стадии. Результаты показали нормальное развитие нематод, получающих различные штаммы бактерий в контрольных условиях. Найдены LD₅₀ Ag – 50 мкг/мл для штамма N2 и 1 мкг/мл для штамма H828Q. NdCTR1 увеличивает выживаемость нематод штамма H828Q в присутствии Ag в среде. На выживаемость штамма N2 NdCTR1 не оказывает статистически значимого влияния.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-00762.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЦИРКАДНЫМИ РИТМАМИ,
В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МОНОЗИГОТНЫХ БЛИЗНЕЦОВ, ДИСКОРДАНТНЫХ
ПО БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Семенова Е.И.¹, Власов И.Н.¹, Партевян С.А.¹, Росинская А.В.², Рыболовлев И.Н.¹,
Сломинский П.А.¹, Шадрин М.И.¹, Алиева А.Х.¹

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт», Москва, Россия

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Приморская краевая
клиническая больница №1», Владивосток, Россия

semyonovak@mail.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся в первую очередь гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции. В настоящее время показано, что развитие патологического процесса при БП может сопровождаться изменением экспрессии ряда генов как в черной субстанции и стриатуме, так и в других тканях. Одной из наиболее доступных и перспективных тканей для фундаментальных исследований и клинического применения является периферическая кровь. Исследования, проводимые в периферической крови, позволили уточнить картину патогенеза БП. С одной стороны, были подтверждены хорошо известные процессы, вовлеченные в патогенез. В то же время, выявлены новые кандидатные гены БП, для которых было показано изменение экспрессии у пациентов. Для минимизации генетического вклада в выявляемые изменения экспрессии генов при изучении БП оптимальным подходом является исследование монозиготных близнецов, дискордантных по данному заболеванию.

В данном исследовании принимали участие три пары монозиготных близнецов, дискордантных по БП. Близнецы с БП находились на 2-4 стадиях заболевания по шкале Хен-Яра и не являлись носителями мутаций, ассоциированных с данным заболеванием. Был проведен анализ РНК-секвенирования периферической крови, в ходе которого было идентифицировано 1512 дифференциально экспрессирующихся генов. Далее с использованием программ Cytoscape и Pathway Studio был выявлен метаболический процесс «circadian behavior» в качестве приоритетного процесса для дальнейшего изучения. Кластер «circadian behavior» включал 10 генов: *ADORA2A*, *AHCY*, *GPR157*, *MTA1*, *NAGLU*, *NR1D1*, *OPRL1*, *PTGDS*, *SRD5A1*, *TP53*. Для данных генов с использованием обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (технология TaqMan) был проведен анализ изменения экспрессии на уровне мРНК. Для генов *PTGDS*, *ADORA2A* и *MTA1* было обнаружено статистически значимое повышение экспрессии у близнецов с БП. Это позволяет предположить, что данные гены могут иметь важное значение в патогенезе БП, и их можно рассматривать в качестве кандидатных генов данного заболевания.

Работа поддержана грантом РФФ №20-15-00262.

КОЛЛЕКЦИЯ ОПЕРАТОРНЫХ МОТИВОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА ARAC

**Серафимович А.С.¹, Вычик П.В.¹, Дигрис А.В.², Дувалов Е.И.²,
Скакун В.В.², Николайчик Е.А.¹**

¹Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск,
Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, факультет радиофизики и компьютерных
технологий, Минск, Республика Беларусь

serafimovichalinasrg@gmail.com

Транскрипционные факторы (ТФ) семейства AraC – одни из наиболее часто встречающихся у бактерий. Так, у *Escherichia coli* их число (26) уступает только представителям семейства LysR. Экспериментально показан контроль ТФ семейства AraC самых разных аспектов клеточного метаболизма: утилизации источников углерода, адаптации к стресс-факторам внешней среды, кворума и экспрессии факторов вирулентности. Возможность определить потенциальные мишени ТФ AraC-семейства в бактериальных геномах может существенно продвинуть понимание функционирования регуляторных сетей в контексте фундаментальных и прикладных задач.

Для ТФ семейства AraC характерно наличие двух различных ДНК-связывающих доменов, димеризационного и лиганд-связывающего домена. Структурные особенности ТФ определяют и организацию распознаваемых ими операторов: как правило, это последовательности длиной 17-20 н.п. без какой-либо симметрии. А поскольку большинство ТФ этого семейства являются димерами, такие операторы чаще всего расположены парами в виде тандемных или палиндромных повторов. Такие особенности операторов затрудняют их идентификацию и моделирование *in silico*, что и определило наш интерес к этому семейству ТФ.

Разработанный нами ранее конвейер в составе программного пакета Sigmoid v2 позволяет выполнять поиск высококачественных операторных мотивов в бактериальных геномах для 36 семейств ТФ. Важной особенностью получаемых с помощью конвейера мотивов является наличие строгого критерия их применимости к другим геномам – последовательности критических аминокислотных остатков ДНК-связывающего домена.

С помощью конвейера Sigmoid сконструировано 45 моделей операторных мотивов ТФ AraC-семейства. Мотивы представляют собой скрытые марковские модели с установленным порогом достоверности, что позволяет осуществлять автоматизированный поиск операторов в исследуемых геномах. Определение пороговых значений для каждого мотива производилось с опорой на экспериментальные данные. Использование моделей операторных мотивов возможно как в приложении Sigmoid, так и на веб-ресурсе BacRegDB, предлагающих удобный пользовательский интерфейс для аннотации сайтов связывания ТФ в бактериальных геномах. Депонированные в BacRegDB операторные мотивы ТФ AraC-семейства количественно и качественно превосходят известные альтернативы в базах данных Prodoic, CollectTF и RegPrecise, содержащие информацию лишь для 17, 19, и 14 ТФ семейства AraC соответственно.

КОМПЬЮТЕРНАЯ МОДЕЛЬ ВКУСОВОЙ КЛЕТКИ ТИПА III, ОТВЕТСТВЕННОЙ ЗА ВОСПРИЯТИЕ КИСЛОГО

Сладков К.Д., Колесников С.С.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный
центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

klimitrich@ya.ru

Восприятие кислого вкуса млекопитающими – важное эволюционное приобретение для избегания неподходящей пищи, такой как незрелые фрукты или гниющее мясо. Вкусовая клетка типа III (ВК III) является элементом системы восприятия кислого вкуса, обеспечивающим хемо-электрическое сопряжение: она контактирует со вкусовым стимулом (раствором с низким рН) и передаёт сенсорную информацию афферентному вкусовому нерву. В работе была построена компьютерная модель ВК III, симулирующая последовательность потенциалов действия в ответ на входящий деполяризующий ток. В построенной модели исследовалась кинетика ионных токов через различные каналы и их роль в ответе на возбуждение. Показано, что для системы дифференциальных уравнений, описывающих отдельные токи, возможно разделение на быструю и медленную подсистемы. Оказалось, что в рамках модели ВК III испытывает суперкритическую бифуркацию Андронова-Хопфа: при величине деполяризующего тока ниже критической (~3 пА) клетка возвращается в устойчивое состояние покоя при большей величине потенциала, при величине выше критической – генерирует последовательность потенциалов действия. Помимо этого, была разработана кинетическая модель протонного канала OTRP1, считающегося молекулярным сенсором кислого в ВК III, который открывается при закислении среды на внешней стороне мембраны. Предлагаемая модель адекватно описала основные свойства тока через протонный канал OTRP1, и была использована для моделирования процесса трансдукции кислых стимулов в ВК III. Показано, что ВК III генерирует серию потенциалов действия с частотой, увеличивающейся (в диапазоне 4-12 Гц) по мере понижения рН стимула. Этот механизм обеспечивает кодирование сенсорной информации.

Работа поддержана грантом РФФ №22-14-00031.

**АНАЛИЗ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ ПО БИОМЕДИЦИНСКОЙ ТЕМАТИКЕ И
ВЫБОР ОПОРНЫХ БАЗ ДАННЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЕДИНОЙ ИНТЕГРИРОВАННОЙ
БАЗЫ ДАННЫХ «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ
ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ»**

Степанов С.В.¹, Попова И.Ю.², Осипов А.А.²

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

stepan.serega2016@yandex.ru

Целью работы было проведение комплексного анализа медико-биологических данных и выбор опорных баз данных (БД) для разработки единой интегрированной базы данных (БД) «Генетические регуляторы и физиологические механизмы индивидуальной устойчивости к формированию посттравматической эпилепсии».

Материалы и методы. В рамках работы изучены условно поделенные на 7 типов БД:

1. БД, содержащие информацию по генам;
2. БД, содержащая информацию о полиморфизме в генах;
3. БД, содержащие информацию по микроРНК;
4. БД, содержащие информацию по белкам;
5. БД, содержащие информацию по метаболитам;
6. БД, содержащие информацию по заболеваниям;
7. БД, содержащие информацию по биологическим путям/процессам.

Применены инструменты интеграции биологической информации из разнородных источников. При этом использовано два типа инструментов интеграции:

1. Ручная реконструкция экспертами с использованием специальных программных средств – редакторов (Reactome, Metacys).

2. Автоматическое извлечение знаний о молекулярно-генетических взаимодействиях различного типа из текстов научных публикаций и баз данных компьютерными методами (методы text-mining). Использованы базы знаний, содержащие факты, значимые для биомедицины, включающих взаимосвязи между – молекулярно-генетическими системами и процессами – заболеваниями и фенотипическими признаками – факторами окружающей среды и др (String, GeneMania, Pathway Commons).

Результаты. Отобраны опорные БД.

RefSeq – БД эталонных последовательностей т.е. аннотированная коллекция общедоступных нуклеотидных последовательностей (ДНК, РНК) и их белковых продуктов.

Uniprot – БД, содержащая информацию по белкам бактерий, вирусов, архей (одноклеточный микроорганизм без ядер-древних микроорганизмов), эукариот (живые организмы, клетки которых содержат ядро- животные, грибы и растения).

OMIM etc- БД, содержащая информацию по заболеваниям. Для нас она интересна т.к. содержит данные по наследуемым заболеваниям человека.

dbSNP – БД, содержащая информацию о полиморфизме в генах 10 организмов.

ClinVar – тоже БД, содержащая информацию о полиморфизме в генах.

GWAS Catalog – БД, содержащая информацию о полиморфизме в генах.

Gene Ontology – БД, содержащая информация по биологическим путям/процессам.

Выводы. Полученные данные лягут в основу дальнейшей работы по трансформированию «сырых» данных в полезную для принятия важных решений информацию.

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ КАРБОАНГИДРАЗ В РАЦИОНАЛЬНОМ ДИЗАЙНЕ НОВЫХ ПРОТИВОГЛАУКОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Столярская М.Я.¹, Коляденко И.А.¹, Шетнев А.А.², Габдулхаков А.Г.¹

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²Центр трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, Ярославль, Россия

stomayar98@gmail.com

Основной проблемой в разработке высокоселективных ингибиторов карбоангидраз человека (hCA) является неизбирательность действия лигандов ввиду высокой структурной гомологии между разными изоформами. Поэтому для оптимизации параметров специфичности соединений в последние годы используют рациональный дизайн, основанный на анализе кристаллических структур комплексов ингибиторов с фармакологической мишенью. Такой подход позволяет еще на этапе доклинических исследований вносить изменения в методику синтеза веществ, что значительно снижает себестоимость их разработки. Однако получение таких структур комплексов остается трудоемкой и времязатратной задачей. По этой причине многие отдают предпочтение моделированию или виртуальному скринингу лигандов внутри кармана связывания.

В связи со сложностью работы с hCA2 – таргетным белком антиглаукомных препаратов, возрос интерес к использованию модельного объекта, имеющего аналогичную архитектуру активного центра и являющегося наименее дорогим коммерческим вариантом. В качестве подобного объекта нами был выбран ортолог hCA2 – вторая изоформа карбоангидразы быка (bCA2). Карман связывания лиганда bCA2 практически идентичен 2-ой изоформе hCA. Для определения перспектив использования модельного объекта в структурно-ориентированном дизайне противоглаукомных препаратов нами было принято решение провести сравнительный анализ кристаллических структур комплексов bCA2 и hCA2 с новым отечественным высокоселективным ингибитором из класса оксазолов ((5-(2-morpholin-4-ylcarbonyl-1,3-oxazol-5-yl)thiophene-2-sulfonamide, L3230).

Анализ кристаллических структур hCA2-L3230 и bCA2-L3230 показал сохранение мотивов взаимодействия коровой части ингибитора с ионом цинка и гидрофобными а.о., однако в структуре bCA2-L3230 удалось идентифицировать поворот бензольного кольца

Phe130, что привело к изменению координирования хвостовой части ингибитора (морфолиновое кольцо) и формированию между ними контакта, который отсутствует в кристаллической структуре комплекса hCA2. Такая конформационная подвижность как аминокислотного остатка, так и лиганда объясняется наличием двух аминокислотных замен в субстрат-связывающем кармане bCA2, а именно V133A и I90V. Несмотря на незначительные отличия в химической природе и размерах боковых групп отличающихся а.о., указанные выше замены повышают лабильность Phe130 и приводят к альтернативному варианту координирования дистальной части ингибитора.

Из полученных данных видно, что использовать bCA2 в качестве модельного объекта для структурно-ориентированного дизайна противоглаукомных препаратов не представляется возможным. Поскольку достоверность структурных исследований hCA2, в противовес моделям-ортологам, позволяет свести к минимуму ошибки в дизайне лигандов, что важно учитывать при рациональном дизайне лекарственных препаратов. Более того, точность современных компьютерных алгоритмов недостаточна для изучения столь тонких нюансов как удаление двух метильных групп из области кармана связывания.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ WIF1, CDO1, RASSF1A, MEST ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Струева П.А., Куревлев С.В.

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

polly.strueva@yandex.ru

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) является одним из наиболее распространённых раков в мире, занимая шестое место в данном рейтинге. За последние годы заболеваемость и смертность от представленной онкопатологии выросли. Лежащие в основе ПРГШ механизмы не выяснены до конца, но в ряде работ обнаруживалась связь гиперметилирования промоторов различных генов и ПРГШ. Более того, было доказано, что в развитии рака принимают участие эпигенетические факторы, в том числе метилирование генов. К примеру, изменения уровня метилирования RASSF1A и WIF1 было ассоциировано с онкопатологией толстого кишечника, MEST – с раком шейки матки, а повышенное метилирование промотора CDO1 – с раком груди.

Цель нашего исследования заключалась в изучении уровня метилирования промоторной части генов WIF1, CDO1, RASSF1A, MEST у пациентов с ПРГШ. Данные гены участвуют в процессах дифференцировки, пролиферации и апоптоза клеток. Гиперметилирование промоторов вышеперечисленных генов было ассоциировано с различными видами онкопатологий.

25 пациентов с ПРГШ приняли участие в исследовании. Образцы опухолевых и нормальных тканей головы и шеи являлись материалом для исследования. Количественный уровень метилирования ДНК оценивался с использованием программного обеспечения Precision Melt Analysis™ (BioRad, США).

В ходе исследования были выявлены достоверные различия между уровнями метилирования промоторов генов CDO1 и WIF1 в опухолевых и нормальных тканях. Средний уровень метилирования промоторной области гена WIF1 и гена CDO1 в нормальной ткани составил $0,15 \pm 0,07$ и $0,26 \pm 0,10$, а в опухолевой – $0,30 \pm 0,18$ и $0,40 \pm 0,19$ соответственно. При этом гиперметилирование промотора гена WIF1 не было выявлено у пациентов с плоскоклеточным неороговевающим раком. Значимые отличия уровня метилирования промотора гена CDO1 были обнаружены для пациентов с плоскоклеточным ороговевающим раком, с рецидивирующей опухолью и с раком гортани. Более того, уровень метилирования промотора гена CDO1 был повышен у курящих больных ПРГШ в сравнении с некурящими пациентами с ПРГШ.

Анализ уровня метилирования промоторов генов RASSF1A и MEST не установил достоверных различий между образцами ДНК нормальной и опухолевой тканей.

Опираясь на полученные результаты, можно заключить, что гиперметилирование промоторов генов WIF1 и CDO1 может являться одним из молекулярных механизмов, которые вовлечены в процесс развития ПРГШ, следовательно, уровни метилирования промоторов данных генов могут выступать в виде диагностического маркера ПРГШ. В то же время, уровень метилирования генов RASSF1A и MEST не рекомендуется применять в качестве биомаркера ПРГШ, хотя уровни метилирования этих генов могут быть значимыми диагностическими маркерами других злокачественных новообразований, что требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России; Договор от 07.10.2021 № 075-15-2021-1356 (внутренний номер Договора 15. СИН.21.0011); (ID: РФ 0951.61321X0012).

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS9 В РАСТЕНИЯХ С ПОЛИПЛОИДНЫМ ГЕНОМ

Сущенко А.С.¹, Лебедева М.В.¹, Злобин Н.Е.¹, Карлов В.Д.¹, Нежданова А.В.²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Москва, Россия

²ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институт биоинженерии,
Москва, Россия

andreysusch2000@mail.ru

Система CRISPR-Cas9 является одним из современных и широко используемых подходов в редактировании генома различных организмов. Применение данного метода в генной инженерии позволяет нокаутировать целевые гены. Белок Cas9 вносит в ДНК двуцепочечные разрывы. Активизирующаяся система репарации склонна к ошибкам и может вносить инсерции и делеции, которые приводят к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации транскрипции либо продукции нефункционального белка. Для идентификации мутаций в диплоидных организмах может использоваться секвенирование по Сэнгеру. Скрининг полиплоидных организмов осложнен вследствие наличия нескольких аллелей одного гена, поэтому в данном случае наиболее подходящий метод – секвенирование

нового поколения (NGS). NGS позволяет прочитывать нуклеотидные последовательности множества образцов за один раз и определять реальное соотношение всех типов внесенных мутаций. Ограничениями метода является его высокая стоимость и трудоемкость в анализе результатов. Поэтому существует необходимость в предварительном скрининге предположительно отредактированных образцов перед последующим секвенированием NGS. Подход с амплификацией участка и его последующим клонированием может быть осложнен большим количеством клонов и секвенирование по Сэнгеру в данном случае малопродуктивно и нецелесообразно. Решением данной проблемы является применение фрагментного анализа. Суть метода заключается в постановке ПЦР с флуоресцентно мечеными праймерами. Далее считывание сигнала в детекторе при капиллярном электрофорезе позволяет определить длину амплифицируемого продукта и детектировать наличие indel-мутаций в образце по сравнению с диким типом.

Нами было проведено сравнение двух методов для анализа мутаций в картофеле, внесенных системой CRISPR-Cas9. Ранее был создан вектор для геномного редактирования и осуществлена агробактериальная трансформация *Solanum tuberosum*, получены растения-регенеранты. Далее была выделена геномная ДНК по методике СТАВ, подобраны и заказаны праймеры с флуоресцентным красителем ROX для детекции редактирования. Проведены ПЦР и фрагментный анализ с амплифицированным целевым участком на приборе Нанофор-05. На полученной хроматограмме пики интенсивности сигнала стандартной ДНК (СД450) соответствовали определенной длине фрагментов, что позволяло установить время прохождения меченой цепи в канале прибора и определить длину фрагмента исследуемых образцов. По результатам анализа в растениях обнаружены мутации в несколько пар нуклеотидов. Далее те же образцы секвенировали с помощью Illumina. Сравнение результатов двух анализов подтвердило точность и эффективность фрагментного анализа для предварительного скрининга отредактированных образцов. Фрагментный анализ позволяет сократить выборку образцов и снизить стоимость анализа.

Работа поддержана грантом РФФИ офи_м №17-29-08024.

ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕЕ КАРТИРОВАНИЕ ЦЕНТРОМЕРНЫХ САТЕЛЛИТОВ *TGUT191A* И *TGUT716A* НА ХРОМОСОМАХ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ЗЕБРОВОЙ АМАДИНЫ

Такки О.Д.¹, Жукова Ю.С.², Галкина С.А.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия

st071188@student.spbu.ru

Несмотря на успехи современных методов секвенирования и биоинформатических инструментов для сборки геномов, центромерные участки хромосом не поддаются расшифровке из-за обогащенности тандемными повторами и часто опускаются в полногеномных аннотациях. Поэтому изучение центромерных участков требует разработки

программ, способных идентифицировать тандемные повторы, а положение найденных последовательностей необходимо подтверждать с помощью цитогенетических методов.

Ранее мы охарактеризовали тандемные повторы у зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*), модельного объекта нейробиологии, биологии поведения и эволюционной геномики. Нам удалось описать тандемные повторы *Tgut191A* и *Tgut716A* и картировать их в области центромеры на митотических хромосомах. Мы показали, что *Tgut716A* и *Tgut191A* в разном соотношении представлены на макрохромосомах, а повтор *Tgut716A* более распространен в микрохромосомах и центромерных участках половых хромосом Z и W. Для более детальной характеристики повторов *Tgut191A* и *Tgut716* мы провели их высокоразрешающее картирование на хромосомах типа ламповых щеток (ЛЩ) методом FISH. Как и ожидалось, при гибридизации с *Tgut191A* и *Tgut716A* мы наблюдали яркие сигналы в макрохромосомах, что позволило соотнести не описанные ранее хромосомы типа ЛЩ зебровой амадины с их метафазными формами по распределению сигналов центромерных зондов и центромерному индексу. В составе микрохромосом ЛЩ сигналы от зондов *Tgut191A* и *Tgut716A* обнаруживаются не только в центромерных, но и в субтеломерных участках в области хиазм, а также наблюдается накопление РНК-продуктов повторов *Tgut191A* и *Tgut716A* на хромосомах и особых РНК-накапливающих структурах – терминальных гигантских петлях.

Среди птиц присутствие центромерных последовательностей в субтеломерных участках хромосом уже было описано при высокоразрешающем картировании центромерных повторов PO41 и *BgIII* на хромосомах типа ЛЩ у японского перепела, а также при картировании повтора CNM у домашней курицы. Эти данные, полученные для хромосом трёх самых изученных видов птиц, могут свидетельствовать о том, что среди птиц накопление одинаковых тандемных повторов в субтеломерных и центромерных участках – это распространенное явление, которое не было описано ранее в связи с малоизученностью центромерных последовательностей в целом.

Авторы выражают благодарность РЦ «ЦКП Хромас».

РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ ПОИСКА ДНК ШТРИХ-КОДА

Тихомирова Т.С.

Институт биологического приборостроения – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

tts05@mail.ru

Штрих-кодирование ДНК широко применяется для каталогизации биоразнообразия с использованием коротких стандартных генетических маркеров. Согласно проекту International Barcode of Life (iBOL) критерии оценки потенциальных штрих-кодов для эукариот включают в себя универсальность для рассматриваемых таксонов, что позволяет разрабатывать широкодиапазонные ПЦР тесты, а также существование исчерпывающего набора эталонных последовательностей для надежной идентификации. Критически важным для разделения таксонов является так называемый «разрыв штрих-кода» [1], характеризующий разницу между внутривидовым и межвидовым эволюционным расстоянием последовательности штрих-кода.

ДНК штрих-коды для прокариот, соответствующие критериям iVOL, такие как ген, кодирующий малую субъединицу (16S) рибосомной РНК, являются удобным инструментом для видовой идентификации микробных сообществ. Гены, кодирующие белок, также признаны обеспечивающими надежное разрешение близкородственных бактериальных таксонов. Одним из таких белков является Hsp60, удовлетворяющий условию повсеместности, достаточной консервативности [2] и высокой надежности разделения таксонов [3]. Hsp60 был предложен в качестве ДНК штрих-кода для видовой идентификации *Staphylococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. и *Lactobacillaceae*.

Поэтому, целью данной работы является разработка инструментов анализа последовательностей для поиска ДНК штрих-кодов и соответствующих им вырожденных праймеров с использованием базы данных Hsp60 для различных типов организмов. Исходные данные, инструменты и результаты анализа доступны по ссылке https://github.com/bioniki2210/sequence_analysis.

Литература.

1. Meyer C.P., Paulay G. (2005) PLoS Biol, 3, e422, doi:10.1371/journal.pbio.0030422.
2. Tikhomirova T.S., Matyunin M.A., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. (2022) Proteins, 90, 1119–1141, doi:10.1002/prot.26294.
3. Links M.G., Dumonceaux T.J., Hemmingsen S.M., Hill J.E. (2012) PLoS One, 7, e49755, doi:10.1371/journal.pone.0049755.

РАННЕЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И ЭНТЕРОТИПОВ МИКРОБИОТЫ

Тойшиманов М.Р.¹, Войцеховский И.В.²

¹Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

maxat.toishimanov@gmail.com

Проблема недостаточной эффективности существующих методов ранней диагностики метаболических нарушений, запускающих процесс развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), является одной из причин высокой смертности от ССЗ. Целью данной работы является создание комплекса методов прогнозирования развития метаболического синдрома, позволяющего выявлять специфические изменения метаболитов аминокислот и витаминов группы В, ассоциированных с микробиотой кишечника, а также аполипопротеинов крови на ранней стадии развития патологического процесса.

Общее число участников исследования – 500 человек (Семей, Алматы), группы: а) «контроль» – лица без метаболического синдрома (МС), б) «случай» – лица с подтвержденным состоянием «метаболический синдром» согласно критериям IDF. Принципиальным отличием от методов, принятых в клинической практике, является исследование сыворотки крови путем определения уровня метаболитов и аполипопротеинов AI, (a), B, C-I, C-II, CIII, E методами жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

Конечным результатом работы будет комплекс методов раннего прогнозирования развития МС путем использования более чувствительных методов и анализа значительно большего объема данных.

Работа выполняется в лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ и поддержана грантом МНВО РК № AP14871855 (2022-2024 гг.)

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА НАН_0240 ГАЛОАРХЕЙ *HALOARCUA HISPANICA* В *ESCHERICHIA COLI*

Топилина М.Ю.^{1,2}, Сюткин А.С.¹, Пятибратов М.Г.¹, Галева А.В.¹

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

topilina.lena@bk.ru

В группе надмолекулярных белковых структур (Институт белка РАН) у галофильной археи *Haloarcula hispanica* был обнаружен новый тип поверхностных структур – ТАТ-нити, основным компонентом которых является белок НАН_0240. Для лучшего изучения процесса синтеза ТАТ-нитей было предложено использовать специфичные к белку НАН_0240 антитела. Полученные к нативному белку *H. hispanica* антитела обладали низкой специфичностью. Возможно, это обусловлено гликолизированием данного белка. Специфическое гликозилирование поверхностных белков широко распространено среди галофильных архей. В соответствии с этим была сформулирована следующая цель – получение и очистка немодифицированного рекомбинантного белка НАН_0240 с помощью гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli*.

Ген *hah_0240* был переклонирован в вектор *pET22b* из плазмиды *pAS102*, ранее сконструированной в нашей лаборатории. Кроме целевого гена (без последовательности, кодирующей N-концевой сигнальный пептид), клонируемая вставка содержала участок, кодирующий 6 C-концевых гистидинов. Была собрана генетическая конструкция *pET22b + hah_0240*, которой трансформировались компетентные клетки *E. coli*, для экспрессии рекомбинантного белка НАН_0240.

Был подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена *hah_0240*. Наибольшая экспрессия наблюдалась у штамма VL-Rosetta в LB среде при температуре от 28 до 30°C. Очистка белка проводилась в денатурирующих и нативных условиях при помощи металл-аффинной и гель-фильтрационной хроматографий. При анализе локализации рекомбинантного белка НАН_0240 в клетках *E. coli* было показано, что он находится в растворимой форме.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №19-04-01327).

ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ СУРФАКТИН-СИНТЕТАЗЫ И ГЕНОВ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ В *BACILLUS SUBTILIS* АКТИВИРУЕТСЯ ПРИ ДЕЛЕЦИИ 6S-1 РНК

Трефилов В.С.¹, Буренина О.Ю.², Елкина Д.А.³, Зверева М.Э.¹, Кубарева Е.А.³

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Москва, Россия

trefilov.vadik@gmail.com

Сурфактин – это циклический липопептид, состоящий из гептапептидного циклического участка и остатка жирной кислоты (C14-C15). Благодаря своей структуре он обладает большой поверхностной активностью и может стать более экологичной альтернативой используемых в настоящее время ПАВ. В то же время, сложность структуры сурфактина делает нерентабельным его химический синтез и единственным путем получения этого соединения является микробиологический синтез. Разработка штаммов-суперпродуцентов сурфактина позволит повысить доступность сурфактина для различных сфер его применения, что позитивно скажется на экологии и существенно понизит риск загрязнения ПАВ окружающей среды.

В работе исследовали влияние нокаута гена 6S-1 РНК на биосинтез сурфактина клетками *B. subtilis* двух штаммов (лабораторного штамма РУ79 и выделенного из почвы дикого штамма NCIB 3610). Методом количественной ПЦР в реальном времени показано, что для обоих штаммов в поздней стационарной фазе роста клеток нокаут гена 6S-1 РНК приводит к повышению уровня мРНК всех генов оперона *surfA*, кодирующего сурфактин-синтетазу.

Для качественного определения сурфактина был использован blood agar метод. Установлено, что штамм РУ79 не способен производить сурфактин из-за наличия мутации в гене *sfp*, кодирующей необходимую для биосинтеза сурфактина 4'-фосфопантетеинил трансферазу. Штамм NCIB 3610 интактен по гену *sfp* и поэтому способен синтезировать сурфактин. Делеция гена 6S-1 РНК в *B. subtilis* NCIB 3610 не влияет на эффективность синтеза сурфактина.

Таким образом было показано, что делеция гена 6S-1 РНК в бактериях *B. subtilis* РУ79 и NCIB 3610 способствует повышению эффективности транскрипции оперона *surfA*.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1396.

НАБОР ПЛАЗМИД «ONE-4-ALL» – УДОБНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ЗАДАЧ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Черняев К.А.¹, Карлов В.Д.², Таранов В.В.²

¹МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
РАН, Москва, Россия

skdw12345@gmail.com

Основной проблемой при классическом клонировании гена в различные векторы рестрикцией и лигированием является подбор самих сайтов рестрикции. Для клонирования одного гена часто необходимо получать ПЦР-продукт для каждой плазмиды, что увеличивает затраты времени и реактивов. Поэтому в рамках данной работы был создан набор *one-4-all*, в который входят векторы для дрожжевой комплементации, двугибридного дрожжевого скрининга, получения двудольных трансгенных растений, наработки белка *in vitro*. В данном наборе плазмид был создан единый сайт клонирования, что позволяет эффективно работать с большим набором генов и не требует подбора специальных условий для клонирования каждого отдельного гена, что позволяет проводить клонирование одного ампликона в любой из разработанных в данной работе векторов. В данном наборе клонирование генов осуществляется по сайтам рестрикции *BsaI* по технологии Golden Gate. При наличии единого сайта клонирования в каждом векторе один ПЦР-продукт можно использовать для клонирования во все имеющиеся вектора, что позволяет исключить процесс подбора условий клонирования для имеющихся векторов и ампликонов. Дополнительно в единый сайт клонирования была добавлена кассета для экспрессии красного флуоресцентного белка. При успешном клонировании ампликона происходит удаление кассеты, экспрессирующей красный флуоресцентный белок, за счёт рестрикции по сайтам *BsaI*, что позволяет проводить быструю селекцию клонов, несущих целевую вставку, по морфологическому признаку.

Данный подход к конструированию генетических конструкций позволяет существенно ускорить и упростить дальнейшие исследования. Использование единственной рестриктазы также снижает финансовые траты. Разработанный набор векторов *one-4-all* представляет особую ценность для исследователей, занимающихся молекулярной биологией растений.

СОЗДАНИЕ НОВОЙ СИСТЕМЫ SDS-PAGE ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ

Шайбакова Ю.Д.¹, Атрошенко Д.Л.^{1,2,3}

¹Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», институт новых материалов и нанотехнологий, Москва, Россия

²Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

shaybakovajuliana@gmail.com

Электрофорез белков в полиакриламидном геле — метод разделения смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Электрофоретическая подвижность зависит от многих факторов, таких как заряд поверхности, форма и размер молекулы и т.д. Добавление SDS (sodium dodecyl sulfate) к белкам приводит к разворачиванию белковых глобул и образованию прочных комплексов SDS-белок. Электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением SDS именуется SDS-PAGE. Добавление SDS в PAGE позволяет повысить разрешение и провести разделение согласно молекулярным массам белков.

Разделение белков с низкой молекулярной массой является сложной задачей. На данный момент наиболее популярным решением этой проблемы является использование Tris-Tricine буферной системы, позволяющий разделять низкомолекулярные белки с высоким разрешением. Однако Tricine является дорогостоящим реагентом и существуют проблемы с его поставками. В данной работе было решено разработать альтернативную систему разделения низкомолекулярных белков на основе Tris-HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).

В ходе работы были проведены эксперименты по выбору оптимальных концентрации акриламида и N,N'-метилден-бис-акриламида в геле, состава буферов, pH и концентрации Tris-HCl в геле и напряжения. Катодный и загрузочный буфер содержали HEPES. В качестве образцов были выбраны человеческая слюна и лизат *Escherichia coli* и маркер Thermo 26632 с диапазоном масс 3,4 – 100 кДа. Также в ходе работы было выявлено, что фиксирующий и окрашивающий растворы на основе метанола позволяют закрепить белки лучше, чем растворы с этанолом.

Таким образом, были подобраны условия для проведения Tris-HEPES SDS-PAGE, позволяющего разделить белки и пептиды с высоким разрешением с минимальной молекулярной массой до 3,4 кДа.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ ПАНИЧЕСКОГО РАССТРОЙСТВА У ПАЦИЕНТОВ МОСКОВСКОГО РЕГИОНА

Шепталина С.С., Кокаева З.Г., Рудько О.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия

sheptalinas@gmail.com

Панические расстройства (ПР) являются распространенным хроническим, многофакторным заболеванием. Данное расстройство характеризуется многократно повторяющимися паническими атаками, которым предшествует приступ тревожности. Распространенность ПР оценивается в 1–3 %, при этом женщины подвержены этому заболеванию в два раза чаще, чем мужчины.

Панические атаки включают в себя ряд повторяющихся симптомов: тахикардию, ощущение нехватки воздуха и удушья, потливость, головокружение, сдавливание в груди, нарастающий страх смерти и потери сознания, ощущение нереальности происходящего. Считается, что проявление ПР связано как с генетическими, так и социальными и экологическими факторами. В связи с развитием методов полногеномных исследований удалось выявить множество новых генов – кандидатов, но до сих пор остается актуальной задачей их верификация, а также оценка роли в заболевании у различных популяций.

Цель данного исследования: выявление ассоциаций с паническими расстройствами для полиморфных вариантов генов *DBH*, *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *ССК*, *ССАР*, *ССАВР*, *СОМТ*.

Для исследования были использованы 114 образцов цельной крови больных ПР. Данные образцы были получены в Лаборатории неврологии и клинической нейрофизиологии НИЦ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Возраст пациентов составил от 22 до 62 лет. Объем контрольной выборки – 180 человек, жителей Москвы и Московской области. Выделение ДНК было проведено из образцов цельной крови с помощью наборов с магнитными частицами Magna™ DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория ИзоГен», Москва). Анализ генов проводился при помощи методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР): ПЦР, ПЦР-ПДРФ, ПЦР-RealTime, SNaPshot.

Для выбранных генов были проанализированы частоты генотипов исследованных выборок. В качестве сравнения использовались группа больных с установленным паническим расстройством и группа здоровых (популяционный контроль).

Впервые на российской популяции показано влияние полиморфных вариантов генов *DBH* rs1611115, *DRD1* rs5326, *DRD2* rs6275, *ССКАР* rs1800855 на развитие панических расстройств. Выявлены комплексные генотипы, которые ассоциированы с ПР, причем наиболее сильное сочетание генотипов *DBH:T+DRD1:T* (шансы риска развития ПР увеличиваются в 30,21), а для генотипа *DRD2:AA* (шансы риска возникновения ПР увеличиваются в 14,46).

Полученные данные могут служить основой для новых экспериментальных исследований, а в дальнейшем для создания эффективных тест-систем для разработки индивидуального подхода к каждому случаю ПР.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ERF1 ЧЕЛОВЕКА

Шувалов А.В.^{1,2}, Клишин А.А.^{1,3}, Шувалова Е.Ю.^{1,2}, Алкалаева Е.З.^{1,2}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Москва, Россия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

Shuvalov@eimb.ru

Терминация является одним из ключевых этапов трансляции. На этом этапе регулируется скорость и эффективность высвобождения новосинтезированных пептидов. eRF1 это главный фактор, обеспечивающий терминацию трансляции у эукариот. eRF1 распознает в А-сайте рибосомы один из трех стоп кодонов UAA, UGA и UAG, после чего при помощи вспомогательного фактора eRF3а индуцирует гидролиз пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы. В регуляцию терминации трансляции также вовлечены ряд дополнительных факторов. eRF1 задействован также в контроле качества трансляции через механизм нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD) и регуляции разнообразия белковых продуктов через механизм сквозного прочтения стоп кодонов. Изучение терминации трансляции имеет и прикладное значение. До 10% орфанных генетических заболеваний человека связаны с возникновением преждевременных стоп кодонов, а способы терапии таких заболеваний заключаются в увеличении сквозного прочтения преждевременных стоп-кодонов. Для представителей двух царств живых организмов (растений и грибов) был описан авторегуляторный контур экспрессии eRF1, зависящий от трансляции основного продукта за счет его С-концевого удлинения. При этом регуляция трансляции eRF1 человека остается не изученной. Для eRF1 известна дополнительная изоформа 2 (eRF1iso2), но ее функциональная активность не описана. eRF1iso2 отличается от основной отсутствием первых 33 аминокислот. Кроме того, мы предположили возможность существования дополнительной удлиненной на 42 аминокислоты с N-конца формы eRF1 (N-ex-eRF1).

С помощью модельных конструкций по интенсивности свечения репортерного продукта люциферазы светлячка и нанолуциферазы мы подробно изучили как влияют на трансляцию различные элементы мРНК, кодирующей фактор терминации трансляции человека – eRF1, а именно 5' нетранслируемый регион (5'UTR), кодирующая последовательность (CDS) и 3'-нетранслируемый регион (3' UTR). Кроме того, мы изучили на всех трех стоп кодонах влияние этих форм на эффективность сквозного прочтения преждевременных стоп-кодонов. Мы показали, что 5'UTR и 3'UTR eRF1 значительно улучшают трансляцию кодируемого продукта для длинных кодирующих последовательностей. Вестерн-блот анализом мы впервые показали существование N-ex-eRF1 в различных клеточных линиях человека. Мы сравнили функциональную активность eRF1, eRF1iso2 и N-ex-eRF1 в трансляции и терминации трансляции. eRF1iso2 оказался практически не активен в терминации трансляции из-за неспособности правильно взаимодействовать с eRF3, сохраняя при этом способность связываться с ним. Активность N-ex-eRF1 в терминации трансляции сохраняется на уровне ~50 % от активности eRF1. При этом eRF1iso2, в отличие от eRF1 и N-ex-eRF1 подавляет трансляцию в целом. Мы не обнаружили С-концевое удлинение eRF1 человека, описанного для растений и грибов. Таким образом, мы описали характер трансляции самого фактора eRF1 и его влияние на трансляцию и терминацию трансляции в целом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01019.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
АНТИАНДРОГЕНОВ AVK-171 И AVK-172 С ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ
АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА

Щербаков К.А., Веселовский А.В., Мехтиев А.Р.

ФГБНУ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

kirill.soff@gmail.com

Рак простаты является одним из наиболее широко распространенных онкологических заболеваний среди мужчин старшего возраста. Рост и пролиферация клеток рака простаты стимулируются мужскими половыми гормонами – андрогенами, тестостероном (Т) и дигидротестостероном (ДНТ). Одним из способов лечения рака простаты является инактивация андрогенового рецептора (AR) антиандрогенами. AR принадлежит к семейству ядерных рецепторов и является лиганд-зависимыми факторами транскрипции. AR состоит из трёх основных доменов: N-концевого домена (NTD), ДНК-связывающего домена (DBD) и лиганд-связывающего домена (LBD).

Основной мишенью антиандрогенов в AR является LBD. Связывание агонистов (Т и ДНТ) с AR приводит к образованию на поверхности LBD сайта связывания коактиваторов AF2. При связывании же антагонистов происходит нарушение геометрии AF2, вызванное смещением спирали H12. В настоящее время в клинической практике широко применяются такие антагонисты AR как бикалутамид, флутамид и энзалутамид. Однако, терапия такими препаратами неизбежно приводит к тому, что антагонисты начинают действовать, как агонисты. Вызвано это возникновением ряда мутаций в LBD. В связи с этим большой интерес представляет разработка препаратов, нечувствительных к данным мутациями.

В Институт биоорганической химии НАН Беларуси были синтезированы два новых стероидных производных, AVK-171 и AVK-172, потенциальных антагониста AR. На клетках линии LnCap методом МТТ была показана их способность подавлять рост клеток, при этом большей активностью обладало соединение AVK-172.

Для выявления предполагаемого механизма действия этих соединений нами было изучено их взаимодействие с LBD-AR методами докинга и молекулярной динамики (МД), как с дикой формой AR, так и с мутантами W741L и T877A. Расчеты МД показали высокую стабильность комплексов LBD с исследуемыми соединениями. Свободные энергии связывания, рассчитанные методом MM-GBSA, показали, что AVK-171 и AVK-172 обладают большим сродством к AR, чем тестостерон или бикалутамид. При этом оба исследуемых соединения показали способность вызывать смещение спирали H12 и конформационные изменения в ней, как в WT-AR, так и в мутантных вариантах рецептора. Наиболее выраженные конформационные изменения в H12 вызывало соединение AVK-172. Таким образом, можно предположить, что активность соединений AVK-171 и AVK-172 обусловлена конформационными перестройками спирали H12 в AR. При этом именно AVK-172 будет являться более выраженным антагонистом как для дикого типа AR, так и для мутантных вариантов W741L и T877A, устойчивым к действию применяемых в медицинской практике лекарств, и может быть рекомендовано для дальнейшего изучения.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

ИНГИБИРОВАНИЕ КИНАЗЫ mTOR КАК НОВАЯ МОДЕЛЬ ИНДУКЦИИ ПОКОЯЩЕГОСЯ СОСТОЯНИЯ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Александрова К.В., Суворова И.И.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

aleksandrova_k_v@mail.ru

В настоящее время одной из неразрешённых проблем в области онкологии остаётся явление рецидива заболевания после, казалось бы, успешного лечения. Одной из достоверных причин рецидива являются покоящиеся диссеминированные раковые клетки, отделившиеся от первичной опухоли и обратимо остановившие свою пролиферацию в специфических нишах организма. При этом до сих пор нет полного понимания природы спящих опухолевых клеток. Предполагается, что покоящиеся раковые клетки способны воспроизводить механизмы клеточного сна, задействованные стволовыми клетками. Так, например, в спящих стволовых клетках подавляется активность киназы mTOR (mammalian target of rapamycin), а её ингибирование вводит эмбриональные стволовые клетки в состояние диапаузы. В данном исследовании мы предлагаем новую модель индукции спящего состояния опухолевых клеток, основанную на ингибировании киназы mTOR.

При различных концентрациях ингибитора mTOR AZD8055 опухолевые клетки глиобластомы (T98G), аденокарциномы лёгкого (A549) и тератокарциномы яичника (PA-1) инкубировались в течение семи дней. AZD8055 эффективно вводил клетки в состояние пролиферативного блока – это было показано при помощи кривых роста и данных секвенирования РНК. Ингибирование mTOR не сопровождалось клеточной гибелью, что подтверждается результатами проточной цитометрии; кроме того, в клетках не происходит увеличения экспрессии генов, участвующих в апоптозе. После отмены действия AZD8055 раковые клетки возобновляли пролиферацию, но в зависимости от концентрации агента клеткам требовалось разное количество времени для восстановления исходной популяции, что говорит о различной глубине индуцируемого состояния покоя опухолевых клеток.

Анализ маркеров стволовости – CD133, CD44, CD49f, – показал, что состояние покоя, индуцируемое воздействием AZD8055, не приводит к увеличению экспрессии данных маркеров в клетках линии PA-1. В наиболее глубоко спящих опухолевых клетках линий A549 и T98G увеличивалась экспрессия CD133 и CD49f соответственно.

Таким образом, мы предлагаем новую модель изучения состояния покоя раковых клеток; на её более полное описание и детальное изучение процессов, сопровождающих ингибирование mTOR, будут направлены дальнейшие исследования.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-10017.

ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИМПЛАНТАЦИИ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА

Асякина А.С., Мелконян К.И., Веревкин А.А., Базлов С.Б., Попандопуло К.И.

Центральная научно-исследовательская лаборатория, Кубанский государственный
медицинский университет, Краснодар, Россия

alevtina.asyakina@mail.ru

Применение синтетических имплантов в реконструктивной хирургии зачастую приводит к развитию послеоперационных осложнений, хроническим болям и дискомфорту. К настоящему времени разработаны ксенодермальные импланты, которые используют при герниопластике передней брюшной стенки, но остается много проблем, которые могут привести к развитию осложнений. Идеальный биоматериал для поддержания мягких тканей должен обеспечивать надежное укрепление тканей без миграции, не ощущаться, быть биodeградируемым, механически прочным, легко имплантироваться с минимальным риском для пациента и быстрым временем восстановления. В связи с тем, что основные вопросы оптимизации лечения послеоперационных вентральных грыж до конца не разрешены, разработка отечественного биологического поддерживающего материала является актуальной задачей.

Цель данного исследования – провести сравнительную оценку тканевой реакции на разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс (АДМ) и коммерческий аналог Permacol™ в отдаленные сроки после герниопластики у экспериментальных животных.

При гистологической оценке разработанного АДМ было определено, что волокна коллагена почти полностью занимают поле зрения, однако расположены разнонаправленно. Результаты анализа Permacol™ показывают более упорядоченное расположение волокон коллагена.

Герниопластика с использованием АДМ и Permacol™ была проведена на свиньях-грыженосителях породы Ландрас возрастом 3 месяца, закрытие грыжевого дефекта осуществлялось методом ненапряжной предбрюшинной герниопластики (методом sublay). На первой свинье герниопластика проводилась с помощью АДМ (10 см x 8 см x 0,05 см), на втором животном – с использованием Permacol™ такого же размера. На 90-й день после пластики грыжи проводили биопсию образцов из области примыкания белой линии живота к имплантированным материалам для оценки степени биodeградации, иммуногенности и прочности ацеллюлярного дермального матрикса и коммерческого аналога Permacol™. При этом у животных не наблюдалось опущения внутренних органов и разрыва материалов в области имплантации.

Анализ образцов животного, которому был имплантирован Permacol™, показал, что имплант не полностью интегрировался в соединительные ткани животного. Клеточный компонент импланта был выражен незначительно и представлял собой преимущественно фибробласты. На границе между апоневрозом и материалом Permacol™ формировались небольшие очаги липоматоза и мелкие серомы. При этом из-за достаточной жёсткости, обуславливающей натяжение импланта, сформировалось незначительное расслоение коллагеновых волокон в апоневрозе.

Образцы тканей животного, которому для пластики грыжи применили АДМ, демонстрировали хорошее вживание импланта и его интеграцию с тканями реципиента. На границе полностью отсутствовали воспалительные изменения. Апоневроз плотно прилегал к

АДМ, при этом ни серьезных кист, ни очагов липоматоза выявлено не было. Клеточный компонент АДМ представлял собой незначительное количество фибробластов.

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа было продемонстрировано, что разработанный АДМ, в отличие от коммерческого аналога, обладает лучшей способностью к интеграции в ткани организма, что позволит ускорить процессы восстановления собственных тканей.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №22-25-00199.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ УСТРОЙСТВА СО СМЕННЫМИ КАРТРИДЖАМИ ДЛЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

**Бакуменко С.С.¹, Римская Б.А.¹, Щербина С.А.¹, Аитова А.А.¹,
Цвеляя В.А.^{1,2}, Агладзе К.И.^{1,2}**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

²ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия

bakumenko.ss@phystech.edu

Одной из наиболее актуальных задач современной медицины является развитие персонализированных методов лечения болезней печени. На сегодняшний день среди альтернативных путей компенсаторной терапии печени стоит выделить следующие биоинженерные подходы: пересадка части органа и клеточных структур, использование аппаратов искусственного диализа и 3D-биопринтинг. В рамках представленной работы мы разрабатываем принципиально новый метод компенсаторной терапии: портативное устройство со сменными картриджами. Преимущество использования данного устройства состоит в том, что сменный картридж с гепатоцитами не удерживает белковые молекулы, ответственные за тромбогенез, в отличие от полупроницаемой мембраны диализатора, а также в отсутствии иммунного отторжения, возникающего при пересадке органа.

На первой стадии разработки был подобран и модифицирован протокол выделения гепатоцитов, основанный на принципе ферментативной перфузии печени, что позволило получить высокоочищенную клеточную культуру. Среднее количество гепатоцитов, выделенных из крысиной печени, составляет ~15 млн клеток из 1 печени крысы. Далее осуществлялся подбор оптимальной подложки с соответствующими адгезивными свойствами. В результате тестирования 8 материалов было установлено, что наиболее подходящей подложкой служит PDMS, покрытый желатином и поликапролактоновыми волокнами. В процессе длительного культивирования шестнадцати линий гепатоцитов, выделенных из лабораторных крыс, было установлено, что клетки нормально функционируют вплоть до 25 дня, образуют кластерную структуру. Проводился спектрофотометрический анализ растворов, которые накапливали ALB в течение различного времени, вплоть до 7 дня. Также, были разработаны и протестированы различные 3D-модели картриджей. Конструкция из картриджа и подложки с гепатоцитами проверялась в системе перфузии *in vitro*.

На следующей стадии исследования будут проведены эксперименты по использованию гепатоцитов, выделенных из печени человека, на разработанном прототипе устройства.

ВЛИЯНИЕ ИБУПРОФЕНА НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ММСК, ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ АДЕНОВИРУСНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ С ГЕНОМ *BMP2*

Басина В.П.¹, Недорубова И.А.¹, Мокроусова В.О.^{1,2}, Меглей А.Ю.^{1,2}, Васильев А.В.^{1,2},
Бухарова Т.Б.¹, Гольдштейн Д.В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический
научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-
исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», Москва, Россия

vika.basina12@gmail.com

Введение. В настоящее время для лечения дефектов костной ткани разрабатываются генотерапевтические подходы, основанные на применении аденовирусных конструкций с генами остеоиндукторов. Основной проблемой использования аденовирусных векторов является возникновение иммунного ответа на их введение. Для снижения иммунной реакции может быть использован ибупрофен. Цель работы: исследование влияния ибупрофена на остеогенную дифференцировку ММСК после трансдукции аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*.

Материалы и методы. В работе использовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), полученные из жировой ткани крыс. Клетки трансдуцировали аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* (Ad-*BMP2*) с титром 320 TCID₅₀/мл в присутствии 0,125 мг/мл ибупрофена (Ibu). Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ-теста через 3 сут. Эффективность вирусной трансдукции анализировали по экспрессии целевого гена методом ПЦР-РВ и продукции белка *BMP-2* методом иммуноферментного анализа. Для оценки остеогенной дифференцировки ММСК через 14 сут. исследовали экспрессию генов остеогенных маркеров методом ПЦР-РВ, активность щелочной фосфатазы, а также минерализацию внеклеточного матрикса (ВКМ) путем окрашивания ализариновым красным.

Результаты. Инкубация с Ad-*BMP2* в присутствии Ibu практически не оказывает действия на жизнеспособность ММСК (89,5±3,6%). Добавление Ibu не препятствует аденовирусной трансдукции: экспрессия гена *BMP2* увеличивается в 32,0±2,6 раза для клеток с Ad-*BMP2* и 48,6±5,9 раз для Ad-*BMP2* с Ibu, а продукция белка *BMP-2* составляет 271,9±15,4 пг/мл и 347,2±20,0 пг/мл соответственно. Наблюдается развитие остеогенной дифференцировки ММСК, трансдуцированных Ad-*BMP2* с Ibu: увеличивается экспрессия генов *Runx2* (7,6±0,6) и остеооптина (9,1±0,3), активность щелочной фосфатазы в 2,9±0,1 раз и наблюдается минерализация ВКМ. Таким образом, использование ибупрофена с аденовирусными конструкциями имеет перспективное значение для генной терапии костной ткани. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147.

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИТНЫХ ФОТОТЕРМИЧЕСКИХ НАНОМАТЕРИАЛОВ ИЗ УЛЬТРАТОНКИХ НЕЙЛОНОВЫХ ВОЛОКОН И ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

Брысякин Е.Р.¹, Райхман Е.В.², Антонова О.Ю.², Кочеткова О.Ю.², Канев И.Л.²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

ozzx4798@gmail.com

Разработка скаффолдов с возможностью дистанционного управления клеточной активностью является перспективной задачей для тканевой инженерии и регенеративной медицины. Важным вкладом в развитие данного направления является получение материалов с топологией, оптимальной для обеспечения пролиферации и роста клеток, содержащих в своей структуре фототермические наночастицы, дающие возможность управлять активностью клеток с помощью внешнего воздействия (ИК-облучения). Методами электроспиннинга и электрораспыления получены композитные волокнистые материалы двух типов. Их основным структурным компонентом служат ориентированные нейлоновые волокна со средним диаметром 60 нм, содержащие фототермические золотые наночастицы, находящиеся внутри волокон (тип 1), либо иммобилизованные на их поверхности (тип 2). Биосовместимость композитных материалов подтверждена путем культивирования модельной культуры нервных клеток. Продемонстрировано значительное увеличение средней длины нейритов при фототермической стимуляции (ИК-облучение с длиной волны 808 нм) клеток нейробластомы SH-SY5Y, культивируемых на поверхности материала типа 1 по сравнению с типом 2. Методом флуоресцентной термометрии показано, что материал типа 1 также обеспечивает более эффективный и равномерный внутриклеточный нагрев при ИК облучении.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-74-10097.

ИЗУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ, В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РАДИОПРОТЕКТОРОВ

**Выпова Е.Р.¹, Купцова П.С.^{1,2}, Комарова Л.Н.¹, Лапенко А.К.¹, Чудновец Т.А.¹,
Берсенева А.А.¹, Брылева Е.А.¹, Кузьмина Ю.В.¹**

¹ Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского
ядерного университета «МИФИ», г. Обнинск, Россия

² Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал «Национальный
медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ,
Обнинск, Россия

elena.vypova@yandex.ru

В настоящее время одной из важнейших и крайне актуальных проблем радиобиологии являются вопросы о разработке эффективных препаратов, направленных на противорадиационную защиту организма человека, в связи с ростом применения источников

ионизирующего излучения во многих сферах деятельности человека (медицина, промышленность, военное дело). В качестве потенциальных радиопротекторов могут выступать два соединения – препарат пептидной природы «Даларгин» (обладает стресс-лимитирующим и антиоксидантным действием) и биоактивный экстракт из мелкой морской рыбы «Биоэкс» (имеет в своем составе большое количество различных аминокислот, которые могут участвовать в инактивации свободных радикалов). Таким образом, целью исследования является изучение возможных радиопротекторных свойств препарата «Даларгин» и биоактивного экстракта из мелкой морской рыбы «Биоэкс».

Объект исследования: клеточные линии hTERT – фибробласты человека и НЕК 293 – клетки почки эмбриона человека. Концентрация «Даларгина» – 1,56 мкМ, концентрация «Биоэкса» – 1280 мкМ. Облучение гамма-квантами (^{60}Co , $E_{\text{ср}} = 1,25 \text{ МэВ}$) осуществляли на Уникальной научной установке «ГУР-120». Мощность дозы составила 0,9 Гр/мин. Дозы облучения: 1, 4, 6, 10 Гр. Радиозащитный эффект оценивали по показателю клоногенной активности.

В ходе исследования показано, что «Даларгин» при действии γ -излучения не оказывает значимого радиозащитного действия на клетки линий hTERT (фактор изменения дозы ФИД = $1,04 \pm 0,09$) и НЕК 293 (ФИД $1,08 \pm 0,11$). Показано, что биоактивный экстракт из мелкой морской рыбы «Биоэкс» также не проявляет выраженного радиопротекторного эффекта как в отношении фибробластов человека (ФИД = $1,09 \pm 0,1$), так и в отношении клеток почки эмбриона человека (ФИД = $1,06 \pm 0,08$) при действии γ -излучения.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК И ПЕГИЛИРОВАННЫХ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ В ПОДАВЛЕНИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА *IN VITRO* МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА.

Высочинская В.В.^{1,2}, Довбыш О.В.², Маслов М.А.³

¹«НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева», Санкт-Петербург, Россия

²«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»,
Санкт-Петербург, Россия

³МИРЭА- Российский технологический университет, Москва, Россия

veravv2509@gmail.com

Сайленсинг генов с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК) является многообещающим терапевтическим подходом в отношении широкого спектра заболеваний, включая онкогематологическое заболевание – хронический миелолейкоз (ХМЛ). Малые интерферирующие РНК (миРНК), направленные против мРНК гена *BCR-ABL*, играющего ключевую роль в патогенезе ХМЛ, могут быть использованы в качестве дополнительного средства к традиционной терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) при лечении ХМЛ. Разработка альтернативного подхода в лечении ХМЛ особенно актуальна с учетом часто развивающейся клинической резистентности к проводимой терапии ИТК. Основной задачей для реализации терапии на основе миРНК остается разработка эффективной системы их доставки в клетки-мишени.

На сегодняшний день липидные композиции считаются одним из наиболее эффективных средств доставки нуклеиновых кислот (НК) с терапевтической целью. Перспективным компонентом липосомальных средств доставки НК являются поликатионные амфифилы на основе холестерина и природных полиаминов. Например, основной структурный компонент липосом – 1,26-bis(cholest-5-en-3 β -yloxy-carbonylamino)-7,11,16,20-tetraazahexacosan tetrahydrochloride (2X3) представляет собой комбинацию двух структурных доменов – гидрофобного и гидрофильного поликатионного, которые соединяются спейсерными группами с помощью линкера карбаматного типа. Данные средства доставки НК показали свою эффективность как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*.

В настоящем исследовании нами была использована синтетическая миРНК, специфичная последовательности мРНК гена *BCR-ABL*, и оценена эффективность ее доставки в клетки эритромиелоза человека линии К-562 с использованием катионных липосом на основе катионного амфифила 2X3 и цвитерионного липида DOPE в молярном соотношении 1:3, модифицированных DSPE-PEG(2000) (1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]): 2X3-DOPE 1:3+DSPE-PEG (0.62%). Эффективность трансфекции миРНК в комплексе с катионными липосомами в клетки и ее подтверждение, а также механизм интернализации оценивались с использованием методов проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. В результате проведенного исследования показана высокая эффективность трансфекции (93,4 \pm 0,4%) в указанные клетки путем механизма эндоцитоза и эффективное высвобождение миРНК из эндосом. Для оценки терапевтического эффекта исследуемых комплексов был оценен антипролиферативный эффект на клетках К-562 с использованием MTS-теста. Было показано, что выживаемость опухолевых клеток, выраженная в % от контроля, значительно снижается после трансфекции исследуемых комплексов через 24 ч, 48 ч и 72 ч от момента трансфекции с максимумом в точке 72 ч (28,9 \pm 1,2%).

Катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3+DSPE-PEG (0.62%) в комплексе с *BCR-ABL* миРНК могут быть предложены в качестве новой противоопухолевой композиции для дальнейшего исследования противоопухолевой эффективности на *in vivo* модели ХМЛ.

ПРОТОТИПЫ КОМПОЗИТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ ПОЛИКАПРОЛАКТОН/ПОЛИЛАКТИД

Голубчиков Д.О.¹, Евдокимов П.В.^{1,2,3}, Путляев В.И.^{1,2}

¹Факультет наук о материалах, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Химический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова ИОНХ РАН,
Москва, Россия

dddannn2113@gmail.com

По всему миру растет количество повреждений костной ткани, особенно заметна данная тенденция в развитых странах, благодаря повышению среднего возраста населения и снижения уровня физической активности. Это приводит к повышенному интересу к материалам, способным поддерживать естественный процесс костной регенерации и имеющим широкий спектр потенциальных клинических применений. Значительное внимание

уделяется пористым 3D структурам на основе керамических, полимерных и композитных материалов. В процессе разработки учитывается необходимость создания био- и механосовместимого материала, который также будет обеспечивать процесс ангиогенеза.

В данной работе в качестве полимерной матрицы были выбраны композиты состава поликапролактон (ПКЛ)/ полилактид (ПЛА). Выбранные биофункциональные термопластичные полимерные материалы обладают достаточной механической прочностью. Создание композитов состава термопластичный полимер/аморфный фосфат кальция может быть эффективной поддерживающей матрицей для клеточной пролиферации, адгезии и остеогенной дифференцировки. Более растворимый, в сравнении с гидроксиапатитом (ГАП), аморфный фосфат кальция (АФК) отвечает за повышение концентрации кальция для поддержания остеогенной регенерации.

Для создания удаляемой керамической структуры было произведено формирование фотополимерной структуры. В качестве материала для печати удаляемой формы использовался фотополимер Castable Wax Resin. Полученные сульфатные структуры наполнялись раствором/расплавом композита методом литья под низким давлением (LPIM), после чего производилось растворение «жертвенной» сульфатной формы в растворе HCl (pH=4) в течение 20-25 минут.

В работе были предложены два метода создания композитов и наполнения частицами аморфного фосфата кальция: из расплава и из раствора. Растворный метод позволяет добиться более равномерного распределения частиц АФК в полимерной матрице. По полученным данным термогравиметрии/масс-спектрологии образцы не содержат следы растворителя (CHCl_3). Согласно данным исследований механических характеристик, полученные композитные структуры имеют предел прочности на сжатие 34 ± 3 МПа и модуль Юнга $1,5 \pm 0,1$ ГПа. Одним из критериев биосовместимости композитных 3D структур может служить исследование образования кристаллов карбонат-гидроксиапатита из раствора искусственной межтканевой жидкости 5·SBF (simulated body fluid). В основном, зародышами для образования данных кристаллов являются частицы фосфатного наполнителя, находящиеся на поверхности композита. Для более глубокого исследования биосовместимости полученных композитов были проведены тесты на цитотоксичность, адсорбцию клеток на поверхности образца и тест на остеодифференцировку.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-19-00219.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Гребешкова Н.А.^{1,2}, Нагайцев А.И.^{2,3}, Давыдова Г.А.²

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева,
Самара, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

³Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия.

nadya.greb@yandex.ru

В настоящее время ожоговая травма является одним из самых распространенных травматических повреждений. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно в мире от ожогов погибает около 60 тыс. человек. Именно поэтому возникает необходимость

разработки инновационных перевязочных средств для лечения ожоговых ран. Перспективным подходом в этом направлении является поиск полисахаридов, обладающих необходимой активностью.

Благодаря огромному функциональному и структурному разнообразию полисахаридов они находят широкое применение в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Однако, для получения материала, свойства которого возможно изменять согласно поставленным задачам для регенеративной медицины, необходимо знать свойства биополимеров, от макро- до молекулярного масштаба.

Целью данной работы являлась разработка сшитых пленок на основе метилцеллюлозы и каррагинана и изучение их физико-химических характеристик, а также биосовместимости.

В данной работе использовались метилцеллюлоза и каррагинан. Каррагинан использовался, так как обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, а также его соседние цепи могут быть сшиты ионами кальция. Метилцеллюлоза в свою очередь обуславливает эластичность и стабильность пленок, а также их повышенную биосовместимость.

Для приготовления пленок растворы метилцеллюлозы и каррагинана заливали в формы и затем высушивали под УФ до полного высыхания. Пленки сшивали раствором хлорида кальция концентрацией 0,25 моль/л, в течение 1-5 минут. Были исследованы растворимость и набухаемость пленок в воде.

Исследование набухаемости показало, что наибольшее количество воды впитала пленка, сшивавшаяся хлоридом кальция в течение 4 минут. Изучение растворимости пленок проводилось в дистиллированной воде и в 1% растворе метилцеллюлозы в течение 1 часа. Исследование показало, что самый большой процент растворимости имели пленки со временем сшивания 2 минуты, который составил примерно 12 %. При этом растворимость этих же пленок в растворе метилцеллюлозы также оказалась максимальной, так как масса пленок уменьшилась почти в три раза по сравнению с изначальной массой.

Влияние сшитых и несшитых пленок на жизнеспособность проводили с использованием клеток фибробластов линии L-929 методом прямого контакта. Показано отсутствие негативного воздействия полисахаридных пленок на жизнеспособность клеток.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ RUNX2 В ПРОЦЕССЕ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОСТЕОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Громова Е.С.^{1,2}, Костина Д.А.¹, Карелкин В.В.³, Смирнова Д.В.^{1,4}, Малашичева А.Б.¹

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

⁴Национальный исследовательский университет ИТМО, 197101, Санкт-Петербург, Россия

kate.gromova01@mail.ru

Runx2 является основным геном, который принимает непосредственное участие в процессах остеогенной дифференцировки клеток. Кроме того, Runx2 влияет на другие важные в возникновении остеофенотипа клеток генные каскады, например, Wnt, Vmp, Msx2 и Notch.

К генам мишеням *Runx2* относятся в том числе гены, кодирующие такие белки как остеопонтин, остеокальцин, *BMP* и другие. В частности, *BMP2* и *BMP4* играют разную роль в становление проостеогенного состояния клетки. Так, *BMP2* является модулятором остеодифференцировки, а *BMP4*, наоборот, её ингибирует, подавляя трансляцию и продукцию остеопонтина, остеокальцина, щелочной фосфатазы.

Действие *BMP*, как и *Runx2* обладает дозозависимым эффектом наряду с тканеспецифичностью. Кроме того, *Runx2* подвергается протеосомной деградации посредством убиквитинирования, что значительно снижает продукцию белка.

Кальцификация является патологическим процессом, который может быть как вспомогательным, так и самостоятельным. К факторам риска возникновения кальцификации относятся различные воспалительные процессы, оксидативный стресс, повышение уровня глюкозы. Эти условия приводят к повышению экспрессии *RUNX2*. Также повышенную экспрессию *Runx2* нередко относят к предикторам развития опухолей.

Остеобласты – клетки костей человека, отвечающие за костеобразование. Синтезируют разные белки, в том числе коллаген, который является важным компонентом внеклеточного матрикса. На ранних этапах дифференцировки активно синтезируют щелочную фосфатазу. Однако остаётся неизвестным, какую роль *Runx2* играет в дифференцировке остеобластов на поздних её этапах.

Исследование выполнено на остеобластах из бедренной кости человека. Проанализировано действие лентивирусных конструкций четырёх типов: *RUNX2 full*, *RUNX2 delta*, *RUNX2 stop*, *ShRunx2*. *RUNX2 full* является полноразмерным геном дикого типа, *RUNX2 delta* – укороченный вариант последовательности данного гена, изоформа *RUNX2 stop* содержит стоп-кодон и конструкция *ShRunx2* несёт шпилечную РНК к *RUNX2*, приводящая к репрессии продукции белка *Runx2*. С помощью лентивирусных конструкций проводили активация/подавление экспрессии *Runx2* в остеобластах.

Биологическое действие конструкций было продемонстрировано в том числе методом вестерн-блоттинга, который выявил повышение продукции белка при внесении их в клетку. Активность промотора оценивали методом измерения активности люциферазы: наблюдали активацию промотора *RUNX2*, при внесении шпилечной конструкции на *RUNX2* – активность промотора падала. ПЦР в реальном времени показала увеличение уровня транскрипции трёх изоформ *RUNX2*.

Влияние гиперэкспрессии изоформ *RUNX2* на остеогенную дифференцировку анализировали с помощью окраски клеток ализариновым красным: усиления окраски не наблюдалось, что коррелирует со снижением уровня экспрессии белка *Runx2* на поздних этапах дифференцировки. Результаты иммуноцитохимии показали повышение продукции белка остеокальцина в ответ на гиперэкспрессию *Runx2*, а *BMP2*, наоборот, претерпевал ингибирование.

Полученные результаты свидетельствуют о сложной нелинейной динамике накопления транскриптов и белка *Runx2* при индукции остеогенного фенотипа остеобластов. Роль и функциональные свойства этой динамике в остеогенной дифференцировке требуют дальнейшего изучения.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗА-ЗАВИСИМОЙ
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ОТВЕТЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПОТОМКОВ НА
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРА
ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НУРЕР

Гурьев Н.А.^{1,2}, Иванова Ю.С.¹, Пуговкина Н.А.¹, Люблинская О.Г.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

guriev.nik.and@gmail.com

Изменения в балансе окислительно-восстановительных процессов в сторону увеличения уровня активных форм кислорода (АФК), которые принято называть «окислительным стрессом», в зависимости от его интенсивности могут приводить к различным эффектам в клетках. Наличие в клетке избыточного количества АФК индуцирует «окислительный дистресс», который может повлечь за собой повреждение компонентов клетки. С другой стороны, небольшое увеличение внутриклеточных окислителей – «окислительный эустресс» – является физиологическим стимулом, который регулирует внутриклеточный редокс-сигналинг. За поддержание редокс-гомеостаза в клетках отвечают антиоксидантные системы, при этом до сих пор было мало известно об их вкладе в ответ плюрипотентных клеток на окислительный стресс.

Недавно разработанная в нашей лаборатории проточно-цитометрическая методика дает нам возможность использовать биосенсор НуРер в качестве репортерного белка, измерение динамики окисления/восстановления которого позволяет количественно оценить различные редокс-параметры в живой клетке. В данном исследовании мы изучили вклад различных внутриклеточных антиоксидантных путей, сделав основной акцент на тех, которые контролируются тиоредоксинредуктазой (TrxR), в поддержание баланса окислительно-восстановительных процессов в плюрипотентных стволовых клетках человека и их дифференцированных клетках-потомках при нормальных условиях и под воздействием H₂O₂-индуцированного окислительного стресса разной интенсивности. Используя ингибиторный анализ, мы показали, что дисфункция TrxR-зависимых ферментных систем приводит к нецитотоксическому нарушению тиол-дисульфидного метаболизма как в плюрипотентных, так и в дифференцированных клетках при нормальных условиях. Кроме того, проводя с применением биосенсора НуРер количественные оценки внутриклеточной концентрации перекиси в клетках в условиях внешнего окислительного стресса, мы продемонстрировали, что в обеих клеточных линиях TrxR-зависимые пути вносят вклад в работу антиоксидантных систем только при низких окислительных нагрузках. В то же время, нами было показано, что при увеличении интенсивности окислительного стресса, основную работу по защите клетки начинает выполнять глутатион-зависимая антиоксидантная система. Таким образом, данное исследование позволило провести комплексный количественный анализ эффективности защиты плюрипотентных клеток человека и их дифференцированных потомков от действия окислительного стресса, а также оценить вклад в этот процесс глутатион- и TrxR-зависимых антиоксидантных систем клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-74-20178.

СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА *SCUTELLARIA BAICALENSIS* GEORGI
КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК КОМПЛЕКСА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Данилова А.А.¹, Семенова С.А.¹, Данилов Л.Г.², Пивоварова Н.С.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия.

² Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi) является типичным представителем растительного семейства с высоким содержанием флавоноидов и дубильных веществ (таннидов). В данной работе мы исследовали способность суспензионных клеточных культур *S. baicalensis* продуцировать активные молекулы, а также изучали профиль накапливаемых макро- и микроэлементов. В результате определен оптимальный субстрат для наработки биомассы, представляющий собой модифицированный вариант среды Мурасиге-Скуга (МС) с гидролизатом казеина (500 мг/л) и 6-бензиламинопурином (6-БАП) в концентрации 1 мг/л. Качественный состав биомассы идентифицировали с помощью цветных реакций и методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭТСХ). В результате подтверждено наличие таких биологических соединений как флавоноиды, фенольные кислоты, каротиноиды, органические кислоты и др. Посредством реакции с 1%-м раствором квасцов железно-аммонийных выявлено наличие таннидов гидролизуемого и конденсированного типа. Методом ВЭТСХ обнаружены флавоноиды: лютеолин ($R_f = 0,75$), рутин ($R_f = 0,56$), лютеолин-7-О-гликозид ($R_f = 0,89$), байкалин ($R_f = 0,41$) и байкалеин ($R_f = 0,29$). Установлено, что выращенная на модифицированном субстрате МС биомасса *S. baicalensis* содержит большее количество кальция (4296 мг/кг), меди (77,69 мг/кг), железа (2367,5 мг/кг), марганца (137,8 мг/кг) и цинка (163,75 мг/кг) в сравнении с интактным растением (Ca = 3638,5 мг/кг; Cu = 11,41 мг/кг; Fe = 380,9 мг/кг; Mn = 19,08 мг/кг; Zn = 13,69 мг/кг). Таким образом, выращивание суспензионных культур *in vitro* становится предпосылкой создания биобанка растительного материала для разработки фитопрепаратов.

СПОСОБЫ КРИОХРАНЕНИЯ И ЭКСПАНСИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА
С ПРИМЕНЕНИЕМ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ

**Дёмина Е.С.¹, Токтохоева Л.Н.¹, Рабданова Н.П.¹, Димитрова А.О.¹, Харахинов А.Ю.¹,
Гонгоров Р.Р.¹, Долодоев А.С.^{1,2}, Цыбденова А.П.^{1,2}, Балханов Ю.С.², Нимаева А.А.³,
Серых М.Ф.³, Мункоева Е.Ж.⁴, Носкова Г.П.⁴, Бутуханова М.Н.⁴**

¹Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия

²МИП «Байкальский центр биотехнологий», Улан-Удэ, Россия

³Шэнэскин, Улан-Удэ, Россия

⁴Бурятская республиканская станция переливания крови МЗ РБ, Улан-Удэ, Россия

yevgeniya.zamurayeva@mail.ru

Проведен полный цикл культивирования мезенхимальных стромальных клеток вартонова студня пупочного канатика человека: от выделения первичных культур, экспансии до криоконсервации/разморозки с применением лизата тромбоцитов.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток осуществляли из вартонова студня пупочного канатика человека ферментативным способом с помощью коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) и эксплантами в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с 5% лизата тромбоцитов. Лизат тромбоцитов получали из лейкоредуцированного пулированного концентрата тромбоцитов. Анализ экспансии, выхода из разморозки после криоконсервации (в разных составах среды и температурных условиях) и длительность пассажей мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика проводили в среде с 5% лизата тромбоцитов в сравнении с клетками, культивированными в среде с фетальной телячьей сывороткой (HyClone, США). Пролиферативную активность оценивали с помощью счётчика клеток (Bio-Rad США). Иммунофенотип мезенхимальных стромальных клеток из вартонова студня пупочного канатика проводили с помощью проточной цитофлуориметрии (Sony Biotechnology, США).

Установлено, что выделенные культуры клеток экспрессируют следующие поверхностные маркеры: CD73, CD90, CD105, CD44, CD29 и характеризуются отсутствием на поверхности: CD34, CD45, HLA-DR, CD11b, CD19. Показано, что при внесении 5% лизата тромбоцитов в среду культивирования морфофизиологические особенности мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика человека (адгезивные, клоногенные веретинovidные и отростчатые прекурсоры) после криохранения сохранялись. Лизат тромбоцитов рекомендуется как альтернатива ксеногенной сыворотки в протоколах *in vitro*.

БАЗАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКОГО ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Демченко А.Г.¹, Балясин М.В.², Смирнихина С.А.¹

¹Лаборатория редактирования генома, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени
Н.П. Бочкова», Москва, Россия

²Научно-образовательный ресурсный центр «Клеточные технологии», РУДН,
Москва, Россия

demchenkoann@yandex.ru

Базальные клетки (БК) легкого являются тканеспецифичными прогениторными эпителиальными клетками, способными к самообновлению и дифференцировке в специализированные клетки легкого. БК, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ЧИПСК), имеют перспективные направления использования, такие как редактирование мутаций при наследственных болезнях, моделирование заболеваний дыхательных путей и клеточная терапия при восстановлении эпителия дыхательных путей. Целью исследования было получить и охарактеризовать линии базальных клеток легкого из ЧИПСК здорового донора и донора с муковисцидозом с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR*, а также оптимизировать невирусную доставку трансгенов в клетки.

Дифференцировку ЧИПСК в БК проводили по опубликованному протоколу с модификацией некоторых этапов. Характеризацию БК на экспрессию маркеров базальных клеток (TP63, CK5, EPCAM) и маркеров специализированных клеток легкого (MUC5AC, SCGB3A2, AQP1, FOXJ1, SFTPB) проводили методом иммуноцитохимического окрашивания, с последующим анализом изображений в программном обеспечении ilastik и CellProfiler. Трансфекцию плазмиды с *GFP* в базальные клетки проводили методом электропорации (Neon). Эффективность трансфекции оценивали методом проточной цитофлуориметрии по флуоресцентному свечению GFP через 48 ч после электропорации.

Получены культуры БК здорового донора и донора с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR* путем клеточной сортировки легочных органоидов и NKX2.1+ легочных прогениторов, дифференцированных из ЧИПСК, по поверхностному маркеру базальных клеток CD271. Иммуноцитохимический анализ подтвердил, что полученные культуры клеток экспрессируют все маркеры базальных клеток, присутствует экспрессия маркеров крупных секреторных клеток (SCGB3A2) и альвеолоцитов 1-го типа (AQP1), что может быть связано с ранней стадией дифференцировки в специализированные клетки. Также в БК, полученных от здорового донора, присутствует экспрессия белка CFTR. Эффективность трансфекции плазмиды с *GFP* в БК составила 25,1±8,5%.

Результаты работы демонстрируют возможность получения мультипотентных базальных клеток легкого, которые стабильно пересеваются, долго поддерживаются в культуре и имеют эффективность трансфекции выше в сравнении с ЧИПСК (2,8±0,8%), что делает их перспективным объектом для редактирования мутации F508del в гене *CFTR* для разработки генной терапии муковисцидоза.

СОЧЕТАНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ НА РОСТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ

**Зельцер А.И.¹, Сурменев Р.А.², Сурменова М.А.², Шайтан К.В.¹, Воинова В.В.¹,
Бонарцев А.П.¹, Жаркова И.И.¹**

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

²Томский политехнический университет, Томск, Россия

angelinazeltser.y@student.msu.ru

Магнитные наночастицы (МН) ввиду их физических свойств предоставляют широкий спектр возможностей для их биомедицинского применения. Концепция магнитного наведения результативна для доставки стволовых клеток *in vivo* в соответствии с пространственным распределением напряженности магнитного поля. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), конъюгированные с МН, можно направленно доставлять в мишень для иммуномодулирующего эффекта. МН комбинируют с оксидами графена для повышения электропроводности материала.

Исследовали пролиферацию МСК крысы в присутствии МН на основе Fe₃O₄ двух типов: покрытые лимонной кислотой (МН1) и МН, содержащие оксид графена, также покрытые лимонной кислотой (МН2). МН добавляли в концентрации 100, 50 и 30 мкг/мл.

Использовали III пассаж МСК, выделенных из костного мозга 5-дневных крыс. Клетки культивировали в ростовой среде (89% Minimum Essential Medium α , 10% (v/v) Fetal Bovine Serum и 1% (v/v) Пенициллин-стрептомицин) при 37°C и 5% CO₂. МСК засеивали в 96-луночный планшет с плотностью клеток $0,75 \times 10^4$. Через 1 сутки после засева вводили МН в концентрациях 100, 50 и 30 мкг/мл и культивировали при 37°C и 5% CO₂ в переменном магнитном поле с индукцией 68 мТ и частотой 0,67 Гц. Пролиферацию клеток на 1 и 4 сутки оценивали с помощью теста AlamarBlue. Критерием цитотоксичности считали жизнеспособность менее 70%.

Проведенный анализ позволил отметить разную динамику роста МСК в присутствии МН разного состава. В присутствии МН1 на 1 сутки наблюдалось снижение роста, а МСК в присутствии МН2 росли активнее, чем в контроле. Однако на 4 сутки в лунках с МН1 с концентрацией 50 и 30 мкг/мл значения приблизились к контрольным, а с МН1 100 мкг/мл также были значительно ниже контроля. В лунках с МН2 произошел спад роста по сравнению с 1 сутками, но не ниже контрольных лунок. Итак, можно наблюдать усиление роста МСК крысы в присутствии МН с оксидом графена в переменном магнитном поле.

Работа поддержана грантом РФФ №20-64-47008.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСОВ ХЛОРИДА КАДМИЯ С
НЕКОТОРЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ЛИГАНДАМИ
(КАРБАМИД, ТИОСЕМИКАРБАЗИД, ХЛОРИД ГУАНИДИНИЯ)

Иванова Т.В.¹, Рукк Н.С.¹, Бузанов Г.А.², Кузьмина Л.Г.², Давыдова Г.А.³,
Белусь С.К.⁴, Кожухова Е.И.⁴

¹РТУ МИРЭА, ИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт Общей и Неорганической Химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

³Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, г. Пушино, Россия

⁴НИЦ – «Курчатовский институт» – ИРЭА, Москва, Россия

taru-lankinen@bk.ru

Комплексы переходных металлов способны демонстрировать противораковую активность. Соединения кадмия токсичны и канцерогенны, хотя в последнее время появились сообщения о его роли в клетке в процессе апоптоза, что делает возможным применение соединений кадмия в качестве противоопухолевых агентов. Их механизм действия состоит в том, что комплексы способны вызывать апоптоз раковых клеток из-за ингибирования активности протеасом. Наночастицы оксида кадмия, возможно, обладают схожими свойствами за счет генерации активных форм кислорода и стимуляции окислительного стресса. Гуанидины (Gua, CH_5N_3) применяются при терапии диабета, а гуанидиновые фрагменты могут входить в состав антибиотиков и фунгицидов. Изученные ранее комплексы гуанидина с переходными металлами обладали противобактериальной и противоопухолевой активностью. Тиосемикарбазид (Tsc, $\text{NH}_2\text{-CS-NH-NH}_2$) обычно выступает в роли хелатирующего лиганда. Тиосемикарбазид, его производные и комплексы обладают интересными биологическими свойствами, включая антивирусную, антиоксидантную, противораковую активности; могут быть прекурсорами для синтеза новых лекарственных препаратов. Производные карбамида (Ur, $(\text{NH}_2)\text{C=O}(\text{NH}_2)$) – нитрозомочевина и гидроксикарбамид – хорошо зарекомендовали себя в онкотерапии, однако они достаточно токсичны. Таким образом, представляет интерес изучение и сравнение свойств комплексов хлорида кадмия с вышеупомянутыми лигандами.

Соединения $\{[\text{GuaH}][\text{CdCl}_3]\}_n$ (**1**), $\{[\text{Cd}(\text{Ur})\text{Cl}_2]\}_n$ (**2**) и $[\text{Cd}(\text{Tsc})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ (**3**) были получены из водных растворов. Их индивидуальность доказана с помощью рентгенофазового и элементного анализов. Координация лиганда была подтверждена с помощью ИК-спектроскопии: для комплекса (**1**) наблюдается смещение полосы поглощения в более коротковолновую область при комплексообразовании, что свидетельствует о наличии протонированной частицы в составе комплекса, тогда как для соединений (**2**) и (**3**) наблюдается обратная картина. Строение комплексов (**1**) и (**2**) было изучено методом РСА. Соединение (**1**) состоит из полимерного аниона, образованного катионами кадмия и хлорид-ионами, и катионов гуанидиния, при этом каждый атом кадмия находится в центре октаэдра, образованного хлорид-ионами. Структура дополнительно стабилизирована за счет образования водородных связей N–H–Cl. Комплекс (**2**) также представляет собой координационный полимер сходного строения, координация лиганда осуществляется через атом кислорода молекулы карбамида.

Данные ESI-масс-спектрометрии свидетельствуют об образовании большого количества подобных по составу частиц, например, Cd_xCl_y ($x = 1-2$, $y=2-5$). Данные цитотоксичности демонстрируют дозозависимый эффект как на линиях раковых (MCF-7), так и на линиях стволовых клеток DPSC. Дополнительно была изучена активность комплекса (1) на следующих клеточных линиях: аденокарциноме простаты PC-3; карциноме толстой кишки HCT-116; Т-клеточном лимфобластном лейкозе Jurkat; карциноме легкого A549. Высокая активность комплексов может быть связана со следующими факторами: общая токсичность кадмий-содержащих веществ; ионное (а не молекулярное) строение комплексов; высокая активность частиц $[CdCl_3]^-$, присутствующих в растворе.

ИЗУЧЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ЯДРЫШЕК ИЗ ООЦИТОВ КРАСНОУХОЙ ЧЕРЕПАХИ

Ильина А.В.¹, Боголюбов Д.С.², Давидьян А.Г.¹, Галкина С.А.¹, Гагинская Е.Р.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

st057025@student.spbu.ru

Ядрышко – ядерный субкомпаратмент, состоящий из комплекса белков и рибонуклеопротеидов, формирующийся вокруг участка ДНК – ядрышкового организатора, ЯОР. Обычно ЯОР состоит из повторяющихся кластеров генов 18S, 5,8S, 28S рРНК, разделенных длинными межгенными спейсерами, IGS. По результатам световой и электронной микроскопии (ЭМ), биохимического и молекулярно-биологического анализа компонентов ядрышка (в первую очередь, полученным для млекопитающих) возникла структурно-функциональная модель, согласно которой в ядрышке выделяют три субдомена, в которых происходят отдельные этапы однонаправленного процесса биогенеза рибосом. На границе фибриллярного центра (ФЦ) и плотного фибриллярного компонента (ПФК) происходит транскрипция рДНК; в ПФК новосинтезированная рРНК процессируется; в гранулярном компоненте (ГК) происходит сборка рибосомных субъединиц. Маркерными белками сайтов транскрипции на границе ФЦ/ПФК являются субъединицы РНК-полимеразы I и UBF, тогда как для ПФК и ГК – белки фибрилларин, нуклеолин и нуклеофозмин, соответственно. У рыб и амфибий описано двухкомпонентное ядрышко. В его составе не выявляется ФЦ, что связывают с более короткими IGS у этих животных. Например, размер IGS у ксенопуса составляет 3–9 т.п.н., а у приматов – около 30 т.п.н. Однако амплифицированные ядрышки, появляющиеся в ооцитах *Xenopus laevis*, содержат все три компонента, в составе ФЦ обнаружены РНК-полимераза I и UBF.

В нашей работе мы исследовали ультраструктуру амплифицированных ядрышек в растущих ооцитах у красноухой черепахи *Trachemys scripta elegans*. Ранее в соматических клетках этих животных были описаны двухкомпонентные ядрышки. Кроме того, в составе IGS обнаружен ген 5S рРНК, функционирующий только в ооцитах. Мы получили серию ультратонких срезов ядер ооцитов половозрелой красноухой черепахи, детектировали маркерные белки с помощью доступных антител методом иммуноголд и провели анализ с помощью ЭМ. Нами обнаружены тельца с вакуолью в центре, предположительно

коилинсодержащие тельца, и гетерогенные по морфологии тельца без вакуоли, содержащие нуклеолин, т.е. являющиеся ядрышками и имеющими двухкомпонентную структуру. Это наблюдение укладывается в существующее представление о зависимости наличия видимого ФЦ от длины IGS. Длина IGS *T. scripta*, собранного из коротких прочтений Illumina (NCBI SRX217618), составляет около 6 т.п.н.

В работе использовано оборудование РЦ ЦКП «Хромас» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ. Работа поддержана грантом РФФ 22-24-00538.

КОМПЛЕКСЫ БРОМИДОВ МЕДИ(II) И ЦИНКА И ИОДИДА ЦИНКА(II) С НИКОТИНАМИДОМ: СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Каберник Н.С.¹, Рукк Н.С.¹, Бузанов Г.А.², Кузьмина Л.Г.², Белусь С.К.³,
Давыдова Г.А.⁴, Гребешкова Н.А.⁴, Иванова А.И.¹

¹Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, РТУ МИРЭА,
Москва, Россия

²Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия
³НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴Институт теоретической и экспериментальной биофизики клетки РАН, Пушино, Россия

kabernik.nikita@yandex.ru

Настоящая работа посвящена получению и исследованию свойств ранее не изученных комплексных соединений некоторых галогенидов цинка и меди(II) с никотинамидом, перспективных для разработки новых противораковых препаратов, альтернативных применяющимся в настоящее время комплексам платины, которые проявляют также ряд побочных эффектов.

Комплексные соединения (NiaH)[Zn(Nia)Br₃] (1), (NiaH)[Cu(Nia)Br₃] (2) и [Zn(Nia)₂I₂] (3) синтезированы в водных растворах из соответствующих галогенидов цинка или меди(II) и никотинамида, взятых в мольном соотношении 1:2 соответственно. Полученные соединения идентифицированы с помощью различных методов физико-химического анализа. В анионных комплексах (1, 2) атом металла расположен в центре искаженного тетраэдра, образованного тремя атомами и атомом азота пиридинового кольца никотинамида, а молекулярный комплекс (3) имеет тетраэдрическое строение с двумя атомами азота пиридиновых фрагментов лиганда и двумя атомами иода. Цитотоксическую активность полученных соединений изучали методом МТТ-теста на постнатальных стволовых клетках пульпы зуба человека (DPSC) и клеточной линии рака молочной железы MCF-7.

Цитотоксичность соединений демонстрирует дозозависимый характер для клеток DPSC и MCF-7. Цитотоксичность соединений (1), (2) и (3) при концентрации 1·10⁻⁴ моль/л для мезенхимальных стволовых клеток DPSC выше, чем для клеточной линии рака молочной железы MCF-7. Причем токсичность для соединения (2) значительно ниже (1) и (3). При концентрации 5·10⁻⁴ моль/л цитотоксичность для соединения (2) по отношению к раковым клеткам выше, чем к стволовым.

НАНОЧАСТИЦЫ ПЛГА КАК СИСТЕМА ДОСТАВКИ 1,2-ДИКАРБОЛЛИДА КОБАЛЬТА ДЛЯ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ ПОСТЕР

**Клименко М.А.^{1,2}, Сокол М.Б.¹, Яббаров Н.Г.¹, Моллаева М.Р.¹, Чиркина М.В.¹,
Сиваев И.Б.³, Брегадзе В.И.³, Никольская Е.Д.¹**

¹Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

klimenko.maksim@yandex.ru

Злокачественные образования по-прежнему остаются одной из основных причин смертности в развитых странах. Перспективным подходом в лечении онкологических заболеваний, помимо классических подходов, представляется бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ). Это бинарный радиотерапевтический метод, который основан на ядерной реакции поглощения стабильным изотопом ^{10}B нейтрона с образованием ^7Li и альфа-частицы с высокой энергией и коротким радиусом поражения, соответствующим размеру клетки млекопитающего, что позволяет воздействовать только на опухолевые клетки, не затрагивая здоровые ткани. Однако для успешной терапии концентрация бора на грамм опухоли должна составлять ~20 мкг. Достичь необходимой концентрации для проведения БНЗТ можно с помощью адресной доставки препарата и наноразмерных систем доставки, синтез которых в настоящее время является перспективным направлением. Интерес представляют наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) благодаря своей биосовместимости и биodeградируемости. Наночастицы ПЛГА могут повысить биодоступность препарата и обеспечить пролонгированное высвобождение лекарства, тем самым поддерживая необходимую концентрацию препарата в опухоли.

В данном исследовании были синтезированы наночастицы ПЛГА с 1,2-дикарболлидом кобальта ($[\text{8,8}'\text{-I-3,3}'\text{-Co(1,2-C}_2\text{V}_9\text{H}_{10})_2]$) методом двойных эмульсий с последующим упариванием растворителя. С помощью планов Бокса-Бенкена при варьировании количества сополимера (ПЛГА), объема растворителя и концентрации стабилизатора эмульсии (поливиниловый спирт) по отношению к постоянному количеству действующего вещества были оптимизированы условия для синтеза наночастиц. Полученные наночастицы были охарактеризованы с определением среднего диаметра (методом динамического светорассеяния), дзета-потенциала и общего содержания препарата (спектрофотометрическим методом).

Синтезированные по оптимизированной технологии наночастицы обладали следующими характеристиками: средний диаметр 228 ± 27 нм, дзета-потенциал $-17,8 \pm 4,1$ мВ, общее содержание препарата 1 масс. %, что представляется перспективным для проведения эффективной БНЗТ с помощью данной системы доставки.

Следующий этап работы связан с проведением биологических испытаний полученных наночастиц для определения оптимального времени инкубации и достижения максимальной концентрации 1,2-дикарболлида кобальта в опухолевых клетках *in vitro* и исследовании фармакокинетики *in vivo*.

ИММОРТАЛИЗАЦИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ОБЫКНОВЕННЫХ ИГРУНОК
(*CALLITHRIX JACCHUS*) С ПОМОЩЬЮ ВАРИАНТОВ ГЕНА ТЕЛОМЕРАЗНОЙ
ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ (TERT)

Коляко Ю.В.¹, Баюрова Е.О.¹, Авдошина Д.В.¹, Кондрашова А.С.¹, Костюшева А.П.²,
Костюшев Д.С.², Гордейчук И.В.¹

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

²Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им.
Е.И. Марциновского, Москва, Россия

yulya.kolyako@mail.ru

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*) широко применяются для моделирования патологических состояний человека и доклинических испытаний вакцин и противовирусных препаратов. Получение перевиваемой культуры гепатоцитов обыкновенных игрунок поможет изучению инфекций, вызываемых гепатотропными вирусами. Целью данной работы являлось получение перевиваемой культуры гепатоцитов обыкновенных игрунок.

Первичную культуру гепатоцитов, полученную из печени мертворожденных животных, трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими TERT человека (*hTERT*) или крысы (*rTERT*). Экспрессию мРНК вариантов *hTERT* и *rTERT* оценивали методом ПЦР с детекцией в реальном времени. Уровень теломеразной активности (relative telomerase activity – RTA) гепатоцитов определяли относительно лизата теломеразно-положительных контрольных клеток MCF7 с использованием $\Delta\Delta Ct$ метода. Влияние экспрессии генов *rTERT* и *hTERT* на морфологические характеристики клеток гепатоцитов (площадь, периметр, солидность, циркулярность) оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии с использованием микроскопа Axio Observer A1 (Zeiss) и программы Image J, а также проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFlex (Beckman Coulter) (прямое и боковое светорассеивание). Для колонигенного анализа клетки сажали в количестве 500, 1000 и 2000 клеток на чашку Петри с диаметром 60 мм. Гетерогенную культуру, экспрессирующую *hTERT*, дополнительно трансдуцировали лентивирусом, кодирующим ген люциферазы светлячка (*luc2*). Уровень биолуминесценции был оценен в приборе In Vivo Imaging System (IVIS; IVIS Spectrum CT, Perkin Elmer) в сравнении с нетрансфицированными клетками (негативный контроль). Субклоны единичных клеток культур, кодирующих *hTERT* и *hTERT+luc2* были получены методом предельного разведения.

Экспрессия *rTERT* и *hTERT* привела к повышению уровня теломеразной активности в сравнении с исходной культурой. Экспрессия *rTERT* привела к уменьшению площади и периметра клеток в сравнении с нетрансдуцированной культурой, что не наблюдалось для *hTERT*. Только экспрессия *hTERT* привела к получению клетками возможности роста в условиях разреженной популяции, что позволило получить клоны единичных клеток. Таким образом, экспрессия гена *hTERT* позволила получить моноклональную культуру гепатоцитов обыкновенных игрунок, а также ее производные, экспрессирующие ген люциферазы светлячка, которые будут использованы в дальнейшей работе.

Финансирование работы проводилось из средств Государственного задания по теме № 308 «Изучение факторов, определяющих направление развития иммунного ответа и патогенеза при вирусных инфекциях».

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕР-2 НА МИКРОНОСИТЕЛЯХ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСА КОКСАКИ ВЗ

Кохликян Е.О., Ивин Ю.Ю., Синюгина А.А.

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный центр
исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»,
Москва, Россия

kohlikyan_eo@chumakovs.ru

Разработка технологии масштабного получения вирусного материала представителей рода *Enterovirus* является актуальной задачей для производства препаратов для диагностики энтеровирусных инфекции. Более того, данная технология может стать основой для получения широкого спектра энтеровирусных вакцин. В настоящее время наработка вирусного материала происходит по классической стационарной технологии культивирования линий клеток человека в роллерных бутылках и флаконах, которая не является масштабируемой. Настоящее исследование направлено на модернизацию технологии культивирования энтеровирусов.

Целью исследования являлась разработка технологии культивирования клеточной линии человека НЕР-2 на микроносителях с последующим культивированием вируса Коксаки ВЗ рода *Enterovirus*. Задачи исследования: определение подходящего типа микроносителя и состава среды для культивирования клеток НЕР-2; подбор параметров культивирования и наработка биомассы культуры клеток НЕР-2 на микроносителях в спиннерных колбах; получение вирусной суспензии Коксаки ВЗ; сравнение титров вируса, полученного на Vero и НЕР-2 при разных способах культивирования клеток.

На первом этапе исследования был проведен масштабный скрининг питательных сред и микроносителей для культивирования клеток НЕР-2. Испытывали среды Игла MEM, DMEM и M199, а также набор микроносителей производства Cytiva, Sartorius и SunResin. В результате скрининга выбрали микроносители и питательные среды, на которых формировался наиболее плотный монослой клеток. Далее подбирали условия культивирования: концентрация микроносителя и скорость перемешивания микроносителей в спиннерных колбах. После подбора параметров наработали клеточную биомассу НЕР-2 с концентрацией $1,3 \pm 0,1 \cdot 10^6$ кл./мл и получили вирусную суспензию Коксаки ВЗ. Полученный вирусный материал был охарактеризован по концентрации вирусных частиц методом 50%-ного инфекционного действия на культуре клеток НЕР-2. Проводили сравнение титров вируса, полученного разными способами культивирования в культурах НЕР-2 и Vero.

Разработанный способ культивирования клеток НЕР-2 с использованием микроносителей позволяет масштабировать процесс наработки культуры-производителя гораздо интенсивнее, чем при использовании стационарного культивирования. Данный метод выращивания клеток НЕР-2 может быть использован для эффективной наработки вирусного материала.

Для адаптации разработанной технологии выращивания клеток НЕР-2 к биореакторному культивированию требуются дополнительные испытания, в том числе процедура ее масштабирования, которые планируется осуществить в будущем.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ АЛЛЕЛЕЙ P.[S466X;R1070Q] И P.[L467F;F508DEL] ГЕНА CFTR НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

Краснова М.Г.¹, Ефремова А.С.¹, Кондратьева Е.И.^{1,2}, Мельяновская Ю.Л.¹, Жекайте Е.К.^{1,2}, Булатенко Н.В.¹, Мокроусова Д.О.¹, Бухарова Т.Б.¹, Гольдштейн Д.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

krasnova.m.g.0605@gmail.com

Наличие дополнительных цис-вариантов в генотипе *CFTR* пациента может снижать общее количество белка CFTR или изменять его структуру: по этой причине назначение эффективной таргетной терапии пациентам с комплексными аллелями может оказаться сложной задачей. Вопрос влияния комплексных аллелей на эффективность таргетной терапии малоизучен, частота их встречаемости в различных популяциях пациентов требует исследования.

Методы: В исследовании принимали участие 5 пациентов с генотипом F508del/[L467F;F508del] и один пациент с генотипом CFTRdele2,3/[S466X;R1070Q]. Остаточная функция CFTR-канала и эффективность CFTR-модуляторов оценивались на модели кишечных органоидов.

Результаты: Частота [L467F;F508del] в РФ составляет 8,2% среди пациентов с генотипом F508del/F508del, частота комплексного аллеля [S466X;R1070Q] – 0,59% согласно данным Регистра РФ за 2020 г. Впервые на модели кишечных органоидов было показано, что обработка таргетными препаратами ивакафтор/лумакафтор и ивакафтор/тезакафтор в концентрации 5 мкМ в течении часа оказывает слабое влияние (на 34% и 25%, соответственно) на восстановление функционального белка CFTR, поэтому они не могут быть рекомендованы пациентам с генотипом F508del/[L467F;F508del] из-за вероятности отсутствия терапевтического эффекта при использовании в клинической практике. Пациентам с данным генотипом может быть рекомендована патогенетическая терапия комбинированным препаратом, сочетающим ивакафтор/тезакафтор/элексакафтор, так как при проведении форсколинового теста на модели кишечных органоидов наблюдается восстановление функциональной активности канала CFTR.

В случае с комплексным аллелем [S466X;R1070Q] не было зафиксировано набухание органоидов при воздействии форсколина, что свидетельствует о полной утрате функции CFTR канала. Кишечные органоиды пациента с генотипом CFTRdele2,3/[S466X;R1070Q] после воздействия CFTR-модуляторов и форсколина не отвечают набуханием, таким образом, хлорный канал при генотипе CFTRdele2,3/[S466X;R1070Q] нечувствителен ни к одному таргетному препарату.

Выводы: Комплексные аллели [L467F;F508del] и [S466X;R1070Q] вызывают полное нарушение функции CFTR-канала. Применение комбинации ивакафтор/тезакафтор/элексакафтор восстанавливает работу канала в случае генотипа F508del/[L467F;F508del]. Терапия известными CFTR-модуляторами будет неэффективна в случае комплексного аллеля [S466X;R1070Q].

РАЗРАБОТКА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ НАНОЗИМОВ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА

Кропанева М.Д.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

kropanevamasha@gmail.com

Нанозимами называют искусственно синтезированные наноматериалы, которые способны имитировать каталитическую активность ферментов. В частности, нанозимы берлинской лазури являются миметиками фермента пероксидазы хрена. Нанозимы берлинской лазури представляют большую привлекательность как альтернатива пероксидазе хрена ввиду простоты и низкой стоимости их синтеза, стабильности и высокой каталитической активности. Однако на сегодняшний день для реального практического применения нанозимов берлинской лазури в конструировании коммерческих тест-систем недостаточно исследований, в которых были бы описаны примеры их использования для определения конкретных мишеней.

Нами были синтезированы диагностические реагенты на основе конъюгатов нанозимов берлинской лазури, модифицированных моноклональными антителами против С-реактивного белка (СРБ). Проведена оценка структурных характеристик, коллоидной стабильности и функциональной активности полученных реагентов.

Показано, что размеры наночастиц в составе конъюгата составляют 219-230 нм, при индексе полидисперсности 0,03-0,08. Продемонстрировано, что нанозимы берлинской лазури, модифицированные моноклональными антителами, сохраняют свои размеры в течение 4 месяцев при хранении в H₂O при +4°C.

В ходе исследований была произведена оптимизация таких параметров колориметрического иммуноанализа для определения С-реактивного белка как: состав блокирующего буфера, количество первых моноклональных антител против СРБ, концентрация диагностического реагента. Показано, что использование фосфатного буфера с добавлением 2% казеина и 1% бычьего сывороточного альбумина позволяет достигать оптимального блокирующего эффекта. Оптимальной концентрацией первых моноклональных антител против СРБ и диагностического реагента являются 0,0025 мг/мл и 0,025 мг/мл, соответственно.

Функциональную активность полученных конъюгатов оценивали при помощи колориметрического иммуноанализа в сэндвич-формате для определения С-реактивного белка в выбранных оптимальных условиях. Было показано, что использование диагностических реагентов на основе нанозимов берлинской лазури позволяет определять С-реактивный белок в концентрации ниже 1 нг/мл, в то время как нормальным значением уровня СРБ по результатам иммуоферментного анализа считается 3-10 мкг/мл.

Таким образом, продемонстрирована эффективность применения конъюгатов нанозимов берлинской лазури в качестве диагностических реагентов для колориметрических иммуноанализов. Полученные результаты также можно использовать при разработке тест-систем к различным биомаркерам.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-75-00025.

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ АДЕНОВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ С ГЕНОМ *BMP2*

Меглей А.Ю.^{1,2}, Недорубова И.А.¹, Мокроусова В.О.^{1,2}, Бухарова Т.Б.¹, Васильев А.В.²,
Гольдштейн Д.В.¹, Кулаков А.А.²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», Москва, Россия

an.megley95@yandex.ru

Введение. В настоящее время для обеспечения эффективной регенерации костной ткани разрабатываются технологии генной терапии, направленные на доставку генов остеоиндукторов в зону костного дефекта. Цель работы: *in vitro* оценка остеогенной дифференцировки культур ММСК при трансдукции аденовирусной конструкцией с геном костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*).

Материалы и методы. Исследование проводили на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенных из жировой ткани крыс и человека. Для трансдукции клеток использовали суспензии аденовирусных конструкций с геном *BMP2* (Ad-*BMP2*) с титром 320 TCID₅₀/мл. Эффективность трансдукции определяли методом ПЦР-РВ по экспрессии целевого гена *BMP2* и методом иммуноферментного анализа по продукции белка *BMP-2*. Развитие остеогенной дифференцировки оценивали на основании экспрессии генов остеогенных маркеров методом ПЦР-РВ и активности щелочной фосфатазы, а также наличию минерализованного внеклеточного матрикса, окрашиваемого ализариновым красным.

Результаты. Показана высокая эффективность трансдукции культур ММСК Ad-*BMP2*, что подтверждается увеличением экспрессии целевого гена *BMP2* и его белкового продукта. При оценке остеогенной дифференцировки для ММСК крыс было показано увеличение экспрессии генов *Runx2*, остеокальцина (*Bglap*) и остеоопонтина (*Spp1*) в $5,2 \pm 1,1$, $1,5 \pm 0,1$ и в $3,5 \pm 0,01$ раз, соответственно, а для ММСК человека – увеличение *RUNX2*, щелочной фосфатазы (*ALPL*) и *SPP1* в $3,4 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,3$ и $2,4 \pm 0,3$ раза, соответственно. Через 14 суток после трансдукции активность щелочной фосфатазы относительно контроля возросла в $2,0 \pm 0,1$ раз для ММСК крыс и в $1,9 \pm 0,2$ раз для ММСК человека. Также показана минерализация внеклеточного матрикса культур ММСК, трансдуцированных Ad-*BMP2*. Таким образом, аденовирусная трансдукция с геном *BMP2* приводит к эффективной остеогенной дифференцировке культур ММСК и впоследствии может быть использована при разработке технологий генной терапии для лечения заболеваний костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-15-00425.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОГЕННЫХ СВОЙСТВ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА, ПОЛИЛАКТИДОВ И ФИБРИНА, ИМПРЕГНИРОВАННЫХ ПЛАЗМИДАМИ С ГЕНОМ *BMP-2* И ИБУПРОФЕНОМ В МОДЕЛИ *IN VITRO*

Мокроусова В.О.^{1,2}, Недорубова И.А.¹, Меглей А.Ю.^{1,2}, Басина В.П.¹, Бухарова Т.Б.¹,
Васильев А.В.², Гольдштейн Д.В.¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,
Москва, Россия

²ФГБУ НМИЦ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России, 119021, Москва, Россия

victoria-mok@yandex.ru

В настоящее время для восполнения дефектов костной ткани особое значение имеет создание ген-активированных матриксов, которые содержат вирусные конструкции с генами остеоиндукторов и не вызывают воспалительного ответа. Цель работы: *in vitro* исследование остеогенных свойств матриксов, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* и ибупрофеном.

Материалы и методы: Матриксыв изготавливали на основе полилактидных гранул (PLA), коллагенового гидрогеля (Col) и фибрина, полученного на основе обогащенной тромбоцитами плазмы (Platelet Rich Plasma, PRP). Матриксыв Col/PLA/PRP были импрегнированы аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* (Ad-*BMP2*) с титром 320 TCID₅₀/мл и 0,125 мг ибупрофена (Ibu). Исследования проводили на мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани крыс (ММСК). Цитотоксичность матриксов Col/PLA/PRP оценивали в течение 7 дней, используя метод МТТ-теста и флуоресцентную микроскопию: все клетки были окрашены РКН-26, живые клетки – кальцеином АМ, а мертвые клетки – DAPI. Адгезию клеток на поверхности матриксов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Для оценки остеогенных свойств матриксов Col/PLA/PRP, импрегнированных Ad-*BMP2* и Ibu, на 14 сутки исследовали экспрессию генов остеогенных маркеров методом ПЦР-РВ, продукцию белков методом иммуноферментного анализа и проводили окрашивание ализариновым красным для выявления минерализации внеклеточного матрикса.

Результаты: Матриксыв Col/PLA/PRP показали высокую цитосовместимость *in vitro* на ММСК. По результатам МТТ-теста было отмечено статистически значимое увеличение жизнеспособных клеток до 113,02±3,12% по сравнению с контролем, что свидетельствует о положительном влиянии на пролиферацию клеток в присутствии матриксов. Также наблюдалась эффективная клеточная адгезия на поверхности матриксов. Культивирование ММСК в присутствии ген-активированных матриксов Col/PLA/PRP, импрегнированных Ad-*BMP2* и Ibu, приводит к значительному увеличению экспрессии генов остеогенных маркеров: 4,4 ± 0,3 раз *BMP-2* и в 7,7 ± 0,7 раз *Alpl* по сравнению с контролем. Причем эти показатели были даже выше, чем для клеток, которые инкубировали в присутствии матриксов Col/PLA/PRP, импрегнированных только Ad-*BMP2* (в 3,1 ± 0,4 раз *BMP2* и в 3,9 ± 0,5 раз *Alpl* по сравнению с контролем). Также было показано значительное увеличение продукции белка остеоопонтина в культурах ММСК после инкубации с исследуемыми матриксами: 631,1 ± 61,3 нг/мл для Col/PLA/PRP-Ad-*BMP2*, и 351,1 ± 44,0 нг/мл для Col/PLA/PRP-Ad-*BMP2* с Ibu, и минерализация внеклеточного матрикса ММСК.

Таким образом, исследования показали, что матриксы Col/PLA/PRP, активированные геном *BMP2* и ибупрофеном, обладают высокой биосовместимостью и проявляют выраженные остеоиндуктивные свойства *in vitro*, что определяет их потенциал для использования в регенеративной медицине костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147.

БИОСОВМЕСТИМАЯ КЕРАМИКА НА ОСНОВЕ ПИРОФОСФАТА КАЛЬЦИЯ С ЗАДАННОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ПОРОВОГО ПРОСТРАНСТВА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСТЕР

Мурашко А.М.¹, Филиппов Я.Ю.^{1,2}

¹Факультет наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²НИИ Механики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

amur2908@gmail.com

Макропористая керамика на основе пирофосфата кальция относится к перспективным материалам для остеопластики, поскольку обладает остеокондуктивностью, хорошей биосовместимостью, биоактивностью и оптимальной скоростью биорезорбции. Одной из основных характеристик материалов, претендующих на роль имплантатов, является остеокондуктивность, которая определяется наличием макропор. В рамках исследования для создания пористого материала используется метод стереолитографической 3D печати, поскольку традиционные методы не позволяют контролировать конечную структуру получаемого каркаса.

Плотную пирофосфатную керамику изготавливали путем формования порошка, содержащего стехиометричную смесь гидроксиапатита, монокальциевого фосфата моногидрата и дигидрофосфата натрия в расчёте на конечный состав, содержащий пирофосфат кальция и смешанный пирофосфат кальция-натрия, с последующей термообработкой при различных температурах. Установлено, что натрийсодержащая добавка положительно влияет на эффективность процессов спекания при низких температурах, однако при температуре 1000°C, необходимой для удаления остаточного углерода в материале, ее введение приводит к неконтролируемому росту кристаллитов. Дальнейшие исследования проводились с составом, не содержащим $\text{CaNa}_2\text{P}_2\text{O}_7$, для которых наилучшие прочностные характеристики и плотности были получены при температуре 1000°C. В работе изучено влияние морфологии и состава порошковых прекурсоров на процессы спекания при данной температуре. Прочность при сжатии плотной керамики составила 154 ± 17 МПа, модуль Юнга – 8.5 ± 2.0 ГПа. Плотность керамики достигает 95%, относительно кристаллографической плотности $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, что свидетельствует об эффективности процесса спекания при выбранной температуре.

pH водного раствора в контакте с изготовленной пирофосфатной керамикой составляет от 6 до 6.2, что является приемлемым для биомедицинского применения материала. После выдержки в течение 7 дней в растворе $5 \times \text{SBF}$ при 37°C на поверхности керамических образцов образовался слой нанокристаллического гидроксиапатита, что свидетельствует о высокой

биоактивности материала. Все предложенные керамические материалы являются биосовместимыми и не оказывают токсического воздействия на клетки, помимо этого, на поверхности керамики наблюдается адгезия и распластывание клеток.

Макропористую керамику (структуры Кельвина с заданной пористостью 70%) изготавливали методом стереолитографической печати с последующей термообработкой, в ходе которой происходит удаление полимерной составляющей материала и спекание керамики. Режим термообработки выбирали в соответствии с дифференциальной кривой термического анализа, с целью предотвратить растрескивание при разложении полимера. Полученная макропористая керамика имеет прочность при сжатии до 5 МПа, что достаточно для проведения хирургических операций. При этом заданная макропористость структур сохраняется после термообработки. Установлено, что плотность и прочность изготавливаемой пирофосфатной керамики увеличивается по мере повышения степени заполнения суспензии порошком.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-19-00219.

ОЦЕНКА УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА CD3 В ИСКУССТВЕННЫХ ВЕЗИКУЛАХ ИЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ВЕСТЕРН-БЛОТ АНАЛИЗА

Мухаметшин С.А.¹, Булатов Э.Р.¹, Змиевская Е.А.¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

saba0203@mail.ru

CAR-T-лимфоциты проявляют цитотоксические свойства, выделяя мембранные производные – везикулы. Мембранные молекулы TCR/CD3 (Т-клеточный рецептор/кластер дифференцировки 3) микровезикул обеспечивают специфическую доставку литических веществ к клеткам-мишеням.

Цель: определить содержание белка CD3 в искусственных везикулах, выделенных из Т-лимфоцитов.

Методы: выделили мононуклеарные клетки периферической крови человека, активировали с помощью T cell TransAct (Myltenyi, США) и IL-2 (SciStore, Россия) (интерлейкин-2) и разделили на две группы. Одну группу повторно активировали. Индуцировали образование микровезикул ультразвуковым гомогенизатором и цитохалазином В. Выделили общий белок и определили его концентрацию измерением оптической плотности при 562 нм. Разделили белки по молекулярной массе в полиакриламидном геле в условиях денатурирующего SDS-электрофореза по Лэммли и перенесли на PVDF-мембрану (поливинилиденфторид). Мембрану окрасили первичными антителами anti-CD3 ζ antibody (Abcam, США), вторичными антителами Goat anti-Mouse IgG (Abcam, США) и антителами к β -актину, конъюгированными с пероксидазой хрена (GenScript Biotech, США).

Выводы: наименьшее количество CD3 относительно β -актина наблюдалось в группах везикул, выделенных из естественных и активированных Т-лимфоцитов, прошедших индукцию цитохалазином. Промежуточные значения нормированного содержания CD3

характерны для естественно секретированных микровезикул, которые не проходили индукцию, при этом в абсолютных значениях в данных образцах был зафиксирован максимум содержания белка. Максимальное количество CD3 относительно β -актина было зафиксировано в везикулах, выделенных из естественных и активированных Т-лимфоцитов после индукции ультразвуком. Цитохалазин активирует отделение везикул от мембраны, сохраняя естественный белковый профиль, в то время как образцы, полученные с помощью ультразвука, демонстрируют более эффективное включение мембранного белка CD3 по сравнению с внутриклеточным β -актином.

Работа поддержана субсидиями, выделенными для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0016.

ВЛИЯНИЕ МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Невдаха В.А.^{1,2}, Владимирова С.А.², Кокорева Н.Е.², Никотина А.Д.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

lera.nev@mail.ru

Введение. Иммунный компонент опухолевого микроокружения является одним из ключевых, значительную часть которого составляют опухоль-ассоциированные макрофаги. Они способствуют опухолевому росту, стимулируют ангиогенез и подавляют иммунный ответ. Малигнизация опухоли опосредована функционированием транскрипционного фактора HSF1, активная форма которого стимулирует синтез белков теплового шока, в результате чего опухолевые клетки приобретают устойчивость к противоопухолевой терапии. Цель данного исследования заключается в изучении влияния моноцитов на систему протеостаза опухолевых клеток, и, в частности, на транскрипционный фактор HSF1.

Материалы и методы. В исследовании использовали клетки карциномы легкого дикого типа, с пустой вставкой и с нокдауном HSF1: A549wt, A549scr и A549kdHSF1 соответственно. В качестве модели человеческих моноцитов выбрали моноцитарную клеточную линию ТНР-1, полученную от пациента с острым моноцитарным лейкозом. В качестве противоопухолевого агента был выбран препарат этопозид, который на данный момент является одним из препаратов 1-ой линии химиотерапии карциномы легкого. Эффект активации HSF1 определялся посредством электрофореза с последующим иммуноблоттингом. Оценка цитопротекторных свойств ТНР-1 проводилась с использованием метода проточной цитометрии и системы xCELLigence, регистрирующей пролиферативную активность клеток в режиме реального времени.

Результаты исследования. С помощью метода иммуноблоттинга мы показали, что при со-культивации раковых клеток с ТНР-1 повышается уровень активной формы HSF1(ser326). В результате анализа данных, полученных с использованием метода оценки активности лактатдегидрогеназы в среде, определили рабочую концентрацию этопозиды для клеток A549scr и A549kdHSF1, которая составила 25мкМ. С использованием метода проточной

цитометрии и системы xCELLigence продемонстрировали цитопротекторный эффект ТНР-1 при обработке раковых клеток этопозидом, а именно меньшую смертность при сочетанном действии этопозида и ТНР-1 по отношению к группе, обработанной только этопозидом.

Заключение. Мы пришли к выводу, что ТНР-1 повышают уровень активного HSF1 в раковых клетках, тем самым увеличивая резистентность к противоопухолевым препаратам.

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА КЛЕТОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМУЛИРОВОК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕПТИДОМ GHK И ГЕПАРИНОМ

Николаева В.А., Зухайб М., Камалов М.И., Абдуллин Т.И.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины
и биологии, Казань, Россия

nikolviktoriia@gmail.com

Биоспецифические олигопептиды являются перспективными ингредиентами систем доставки лекарств в качестве клеточно-проникающего и/или биоактивного компонентов. Ранее было показано, что глицил-L-гистидил-L-лизин (GHK) – плейотропный модулятор роста – синергетически усиливал клеточно-проникающий эффект таргетного пептида L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (RGD) в составе поверхностно-модифицированных липосом¹. Актуальной задачей является изучение совместных эффектов GHK с другими лигандами, например, с гликозаминогликанами (ГАГ), участвующими в клеточных взаимодействиях и передаче сигналов. Подобное исследование предполагает разработку наноразмерных носителей, таких как липосомы, характеризующихся биоимитирующей структурой, простотой получения и модификации, с совместно иммобилизованными пептидом GHK и ГАГ.

Целью настоящей работы явилось получение липосомальных формулировок, модифицированных GHK и гепарином в качестве модельного ГАГ, и оценка их влияния на жизнеспособность клеток млекопитающих.

Конъюгат GHK с лауриновой кислотой (LA) и униламеллярные липосомы на основе фосфатидилхолина и LA получали методами твердофазового синтеза и тонкопленочной гидратации, соответственно. Иммобилизацию GHK, а далее гепарина на поверхности липосом проводили *in situ* при соинкубации растворов. Методом динамического рассеяния света подтвердили последовательную ассоциацию пептида и гепарина, сопровождающуюся заметным усилением анионного заряда системы. Дзета-потенциал полученной формулировки составил –30 мВ с сохранением однородности системы (ИПЧ = 0,055) и незначительным повышением гидродинамического диаметра до 133.3 нм по сравнению с исходными липосомами. Исходные липосомы при концентрации липида выше 125 μM частично ингибировали пролиферацию 3Т3 фибробластов, снижая их жизнеспособность до 40% относительно контрольных (необработанных) клеток. При этом GHK-гепариновый компонент, представленный на поверхности липосом, не только нивелировал цитотоксический эффект липида, но даже стимулировал клеточную пролиферацию фибробластов. В отсутствие гепарина GHK не оказывал положительного воздействия на клетки в экспериментальных условиях, при этом его дополнительная иммобилизация на GHK/гепариновом компоненте, наоборот, усиливала пролиферативный эффект композиции.

Полученные результаты представляют интерес для создания наноразмерных липосомальных формулировок, модифицированных пептидами и гликозаминогликанами, с клеточно-проникающими и цитопротекторными свойствами.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-10105).
Ссылка на информацию о проекте: <https://rscf.ru/en/project/20-73-10105/>.

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕССЫ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

**Переpletчикова Д.А.¹, Костина Д.А.¹, Карелкин В.В.², Хворова И.А.¹,
Лобов А.А.¹, Малашичева А.Б.¹**

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии
имени Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

dasha_perepletch@mail.ru

Кость является высокоvascularизированной тканью, поэтому кровеносная система оказывает непосредственное влияние на ее развитие, рост и регенерацию. Однако перекрестные клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействия эндотелиальных клеток и остеобластов, остаются неясными.

Цель данной работы состояла в изучении влияния эндотелиальных клеток (ЭК) на процессы остеогенной дифференцировки. Для этого нами были проведены эксперименты в системе контактного сокультивирования первичной культуры остеобластов и ЭК пупочного канатика человека. Эффективность остеогенной дифференцировки оценивали по уровню минерализации внеклеточного матрикса на 14 день сокультивирования. Для выявления ранних триггеров остеогенной дифференцировки через 48 часов сокультивирования смешанную культуру разделяли при помощи магнитного сортирования по эндотелиальному маркеру CD31. Методом РВ-ПЦР оценивали изменения уровня экспрессии ключевых генов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку. Далее проводили комплексный протеотранскриптомный анализ отдельно для остеобластов и ЭК.

Было выявлено, что при контактном сокультивировании ЭК обладают остеоиндуктивными свойствами и усиливают остеогенную дифференцировку. Методом РВ-ПЦР было установлено, что при сокультивировании происходит активация экспрессии генов сигнального пути Notch: HEY1, Dll4, Jag1, SNAIL, SLUG и маркера остеогенной дифференцировки RUNX2. По данным протеотранскриптомного анализа также наблюдали активацию RUNX2 и Notch-опосредованную активацию генов остеогенной дифференцировки: Notch3, Dll1, Jag1, HEY2 и HEYL. Полученные результаты, указывают на то, что при контактном сокультивировании ЭК обладают остеоиндуктивными свойствами, и эти свойства реализуются главным образом при участии сигнального пути Notch.

Работа поддержана грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

РОЛЬ БЕЛКА КРОВИ SMD-2 В АКТИВАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ РАЗЛИЧНЫМИ СТРУКТУРАМИ ЛПС И АЛЛЕРГЕНОМ DER P 2

Радзюкевич Я.В.¹, Косякова Н.И.², Прохоренко И.Р.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Больница Пушкинского научного центра РАН, Пушино, Россия

sibiryak93@mail.ru

Введение. Известно, что аллерген Der p 2 усиливает синтез провоспалительного цитокина TNF- α и хемокина IL-8 при одновременном действии с ЛПС *E. coli*. Попадание в кровь аллергена Der p 2 дополнительно инициирует экспрессию клетками цельной крови человека растворимой формы белка MD-2 (sMD-2) – важного транспортного белка в ЛПС-сигнализации. MD-2 играет значимую роль в распознавании структуры ЛПС. В настоящей работе исследовался вклад MD-2 и sMD-2 в активацию клеток крови различными структурами ЛПС и аллергеном.

Материалы и методы. Для исследования влияния sMD-2 на активацию клеток крови ЛПС и аллергеном в образцы цельной крови условно-здоровых доноров за 30 минут до активации вносили блокирующие антитела (anti-MD2 antibody («Abcam», UK)) в концентрации 0,8 мкг/мл. Затем к соответствующим образцам добавляли ЛПС *E. coli* или ЛПС *S. enterica* в концентрации 40 нг/мл, экстракт аллергена (DpE) в концентрации 30 мкг/мл и DpE и ЛПС одновременно в тех же концентрациях. Образцы крови инкубировали 6 ч при 37° и 5% содержании CO₂ в CO₂-инкубаторе. Затем клетки крови осаждали и в сыворотке определяли содержание цитокинов методом твердофазного ИФА.

Результаты. При одновременной активации клеток крови эндотоксином (ЛПС) и экстрактом аллергена Der p 2 усиливался синтез цитокина TNF- α по сравнению с активацией только ЛПС. Мы обнаружили, что данный эффект связан с увеличением количества растворимой формы белка MD-2 в крови при действии Der p 2. Такое увеличение содержания белка может обеспечить оптимальную доставку ЛПС к эффекторным клеткам. Проведённые исследования показали, что блокирование связанного MD-2 и sMD-2 с помощью гомологичных антител снижало уровень провоспалительного цитокина TNF- α , нарабатываемого в ответ на комбинацию ЛПС и DpE. Однако, даже с заблокированным sMD-2 количество TNF- α , нарабатанного в ответ на комбинацию DpE и ЛПС оставалось выше, чем в ответ только на ЛПС. Из полученных результатов следует, что Der p 2 усиливает ответ на ЛПС не только за счёт активации синтеза sMD-2, но и за счёт собственной функциональной гомологии с этим белком. В отличие от MD-2, ни растворимая форма MD-2, ни DpE не различают структуру эндотоксина, обеспечивая одинаковый уровень синтеза TNF- α клетками крови как на ЛПС *E. coli*, так и на ЛПС *S. enterica*.

Различия в ответах клеток крови на разные структуры ЛПС наблюдались в синтезе хемокина IL-8. Эндотоксин *E. coli* вызывал достоверно меньшую выработку хемокина по сравнению с эндотоксином *S. enterica*. Одновременная активация аллергеном и ЛПС из *E. coli* и блокирование белка MD-2/s-MD-2 не влияли на синтез IL-8 клетками крови, а активация аллергеном и эндотоксином *S. enterica* снижала уровень нарабатываемого клетками IL-8. При активации клеток крови DpE и ЛПС *S. enterica* и блокировании MD-2 подавления синтеза хемокина аллергеном не наблюдалось.

Выводы. Являясь функциональным гомологом белка sMD-2, аллерген Der p 2 способен как действовать синергетически с MD-2, так и выполнять его функции, активируя клетки врожденного и приобретенного иммунитета к синтезу провоспалительного цитокина TNF- α . Белок sMD-2 участвует в совместной активации клеток крови эндотоксином и аллергеном.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНАЦИИ НА ОСНОВЕ ФДТ-ИНДУЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ GL261 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСА

**Редькин Т.С.¹, Савюк М.О.^{1,2}, Слепцова Е.Е.¹, Турубанова В.Д.¹,
Ведунова М.В.¹, Крысько Д.В.^{1,2,3}**

¹ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT), факультет анатомии и реабилитации человека, Гентский университет, Гент, Бельгия

³Институт исследований рака, Гент, Бельгия

big.t.nsdav@outlook.com

В настоящее время не разработано оптимальных методов лечения онкологических заболеваний, которые бы гарантировали пациенту полное выздоровление и отсутствие рецидива. Иммуногенная клеточная смерть (ICD) подразумевает активацию специфической реакции иммунитета относительно трансформированных клеток, как результат выделения мертвыми/умирающими клетками молекул, ассоциированных с повреждением (DAMPs). Одним из методов индукции ICD является фотодинамическая терапия (ФДТ).

Целью стала разработка модели для оценки способности активации специализированного противоопухолевого иммунитета при использовании ФДТ *in vivo*.

Клеточная линия глиомы GL261 культивируется в CO₂-инкубаторе, и для фотодинамического воздействия используется препарат Фотосенс® (Photosens®, Russia). Клеточная линия GL261 инкубируется в бессывороточной среде с добавлением раствора Фотосенса в течение 4 часов, затем питательная среда заменяется на полную, клетки подвергаются фотоиндукции в дозе 20 Дж/см² и далее инкубируются 24 часа в CO₂-инкубаторе. Вакцинация мышей предполагает подкожную инокуляцию умирающих/мертвых клеток глиомы после фотодинамического воздействия с промежутком введения 7 дней. С одной стороны мыши вводятся вакцина, а с другой – живые опухолевые клетки. Манифестация и контроль развития опухолевого очага производится путем измерения объема опухоли на прививаемой стороне на протяжении 28-32 дней.

Наблюдалось подавление развития опухолевого очага при использовании выбранного фотосенсибилизатора в сравнении в контрольной группой.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-25-00716 (<https://rscf.ru/project/22-25-00716/>).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
РЕКОМБИНАНТНОГО СЕЛЕНОПРОТЕИНА SELENOM
НА КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Рогачев В.В.¹, Нефедова Н.Б.^{1,2}

¹Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный
центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт»,
Пушино, Россия

vladimirrogachevb@gmail.com

SELENOM — высоко консервативный белок, встречающийся у разных видов и классов животных и принадлежащий к семейству белков с тиоредоксин-подобной укладкой: он имеет консервативный мотив CXXU в каталитическом центре (где С — цистеин, Х — любые две аминокислоты, U – селеноцистеин). Исследования роли SELENOM в канцерогенезе ограничиваются данными об экспрессии этого белка в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, поэтому целью настоящей работы являлось исследовать молекулярные механизмы цитотоксического действия рекомбинантного селенопротеина SELENOM на клетки глиобластомы человека.

На первом этапе мы получали рекомбинантный SELENOM человека в препаративных количествах в бактериальной системе.

Для изучения влияния полученного нами экзогенного SELENOM на пролиферативные свойства раковых клеток A-172 (глиобластома человека) мы инкубировали эти клетки в течение 24 ч с данным белком в различных концентрациях (50 мкг, 100 мкг, 200 мкг). В качестве контроля использовали эквивалентные объемы буфера. Затем проводили тест МТТ и с помощью флуоресцентной микроскопии оценивали количество клеток, ушедших в апоптоз.

Помимо этого для изучения эффектов экзогенного SELENOM на Ca²⁺-сигнальную систему клеток, культуры загружали кальций-чувствительным зондом Fura-2AM и с помощью флуоресцентной микроскопии регистрировали изменение базового и тапсигаргин-индуцированного изменения уровней цитозольного кальция ([Ca²⁺]_i) после 24-х часовой инкубации с различными концентрациями SELENOM.

Согласно результатам МТТ-анализа, можно заключить, что существенное снижение пролиферативных свойств клеток глиобластомы приблизительно на 40 и 80% наблюдалось при воздействии на клетки 100 и 200 мкг белка, соответственно. Тогда как добавление эквивалентных объемов буфера достоверно значимо не оказало влияния на пролиферацию данных клеток.

Также нами было обнаружено что большая часть клеток глиобластомы уходила в апоптоз, который сопровождался усилением экспрессии мРНК ряда про-апоптотических генов, усилением стресса эндоплазматического ретикулума и активацией IRE1 α -сигнального пути UPR. Полученные результаты демонстрируют также дозозависимое истощение Ca²⁺-пула под действием SELENOM, что доказывает важную роль данного белка в регуляции кальциевого гомеостаза в клетке.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00030.

НАНОЧАСТИЦЫ LuF_3 КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ

Романов М.В.¹, Шемяков А.Е.^{1,2}, Попов А.Л.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пушино, Россия

²Физико-технический центр Физического института имени П.Н. Лебедева, Протвино, Россия

rmvya@yandex.ru

Несмотря на успехи использования протонов при лечении сложно локализованных опухолей, все еще существуют трудности при лечении радиорезистентных опухолевых новообразований. Одним из наиболее перспективных подходов увеличения эффективности терапии является использование селективных радиосенсибилизаторов. Эти вещества способны накапливаться в опухолевых клетках и вызывать развитие состояния окислительного стресса и многочисленные повреждения ДНК после облучения пучком протонов, что, в конечном счете, приводит к их гибели. Одним из таких перспективных веществ является нанокompозит фторида лютеция (LuF_3), обладающий выраженными сцинтиляционными свойствами.

В рамках данной работы была проведена оценка цитотоксичности цитрат-стабилизированных наночастиц фторида лютеция на культуре клеток меланомы линии В-16/F10. Нами было установлено, что наночастицы LuF_3 в концентрациях 100, 500, 250 и 125 мМ не вызывает гибель клеток через 24, 48 и 72 часа соинкубации, однако способствуют снижению их митохондриального мембранного потенциала в дозо-зависимой манере при концентрациях 250 мМ и выше, что было детектировано с помощью потенциал-чувствительного красителя. Результаты МТТ-теста так же показали уменьшение метаболической активности клеток при повышении концентрации наночастиц. Так через 24 часа сокультивирования только клетки при концентрации наночастиц в 125 мМ не продемонстрировали статистически значимого снижения активности, в то время как через 48 и 72 часа все исследуемые концентрации частиц LuF_3 приводили к снижению метаболической активности клеток.

В рамках работы по оценке радиосенсибилизирующей активности наночастиц фторида лютеция нами разработана экспериментальная модель с использованием культуры клеток меланомы мыши линии В-16 при их облучении пучком протонов на терапевтическом комплексе «Прометеус» (АО Протом) (подобраны дозы облучения и позиционирования облучаемого объекта, а также условия подготовки и культивирования клеточной культуры). В дальнейшем планируется оценить радиосенсибилизирующие свойства наночастиц LuF_3 при воздействии пучка протонов при облучении культур клеток в пике Брэгга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-73-10231.

ТРАНСФЕКЦИЯ siRNA В КЛЕТКИ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX*

Садриев К.А.¹, Гирич А.С.²

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия.

sadriev.ka@dvfu.ru

В сравнении с другими животными, использующимися в качестве модельных организмов в биологии развития, голотурия *Eupentacta fraudatrix* имеет ряд интересных особенностей. В стрессовых условиях, животное «выплевывает» часть внутренних органов (эвисцирует), а затем примерно в течение месяца восстанавливает утраченное и возвращается к полноценной жизнедеятельности. После эвисцерации, происходит регенерация всего кишечника а также переднего комплекса органов, называемого у голотурий аквафарингальным. Примечательно, что ведущую роль в ходе такой регенерации играет перестройка фенотипа эпителиальных клеток, которые приобретают способность к дедифференцировке и даже трансдифференцировке, что позволяет им в полной мере заместить функционал утраченных в ходе эвисцерации клеток.

Одним из способов, позволяющих выявить роль отдельных генов в регенерации, является их нокдаун с использованием механизма РНК-интерференции, в основе которого лежит способность эукариотической клетки осуществлять специфическую деградацию мРНК в ответ на введение в нее двухцепочечной РНК к определенному гену. Целесообразность данного подхода применительно к голотуриям впервые была продемонстрирована на голотурии *Holothuria glaberrima*.

В нашей работе, мы адаптировали трансфекцию малых интерферирующих РНК (small interfering RNA – siRNA) для голотурии *E. fraudatrix*. Для этого, была сконструирована siRNA, меченная с 5' концов флуоресцентным красителем и произведена ее трансфекция с помощью электропорации в регенерирующую после эвисцерации голотурию. С учетом подобранных параметров тока (15V, 45 ms, 7 импульсов с интервалами в 950 ms), флуоресцентно-меченные клетки обнаруживались как в регенерате аквафарингального комплекса, так и в стенке тела. Также, не было отмечено сильного нарушения процесса регенерации из-за воздействия тока.

Далее был произведен нокдаун одного из генов домашнего хозяйства, *eef1a*. В результате произошли значительные нарушения в регенерации аквафарингального комплекса, а ПЦР в реальном времени показывает снижение экспрессии *eef1a*. Указанных эффектов не наблюдалось при электропорации буфером не содержащем siRNA к *eef1a*.

Таким образом, нами была произведена нокдаун одного из генов *E. fraudatrix*, что открывает перспективы для дальнейшего нокдауна генов, задействованных в регенерации у этой голотурии.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-74-30004.

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В РОЛИ ДОСТАВЩИКОВ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Спицына А.С.¹, Гараева Л.А.-А.^{1,3,4}, Путевич Е.Д.^{1,4}, Толстыко Е.А.¹, Гармай Ю.П.¹,
Емельянова С.С.¹, Ястремский Е.В.³, Комарова Е.Ю.², Сизова И.А.¹, Штам Т.А.^{1,2,3}

¹НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»,
Санкт-Петербург, Россия

anastasis.8@yandex.ru

Экстраклеточные везикулы – наноразмерные частицы с двойной липидной мембраной, переносящие белки и нуклеиновые кислоты. Из-за своей способности целенаправленно доставлять биоактивные молекулы без деградации они представляют собой перспективные системы доставки лекарственных веществ. В последние годы в качестве таких систем зарекомендовали себя наночастицы растительного происхождения. В частности, было показано, что нативные экстраклеточные везикулы из грейпфрута весьма успешно доставляют экзогенный белок в клетки человека. В то же время контролирование процесса культивации микроводорослей и секреции везикул позволяет в перспективе унифицировать процесс выделения нанообъектов.

В данной работе везикулы, выделенные из микроводорослей хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*) и хлореллы (*Chlorella vulgaris*), оценивались в качестве возможных доставщиков экзогенного белка (HSP70) в клетки человека *in vitro*.

Везикулы из культуральной среды были выделены методом последовательного центрифугирования; в ходе работы были подобраны оптимальные условия, при которых микроводоросли продуцируют наибольшее количество частиц. С помощью ультразвука везикулы нагружали флуоресцентно меченным белком HSP70-Alexa647. Размеры частиц были оценены следующими методами: атомно-силовой микроскопией, анализом траектории наночастиц и динамическим рассеянием света; метод криоэлектронной микроскопии позволил оценить морфологию везикул; при помощи электрофоретического рассеяния света был получен дзета-потенциал выделенных наночастиц; флуориметрия позволила оценить влияние перечисленных параметров на эффективность загрузки экзогенного белка в везикулы. Далее везикулы были соинкубированы с клетками человека и при помощи проточной цитометрии, была проанализирована эффективность захвата клетками везикул, нагруженных белком.

Размеры везикул из микроводорослей варьируются в диапазоне от 30 до 200 нм. Дзета-потенциал для частиц из обоих продуцентов лежит в области от -3 до -5 мВ. Форма везикул преимущественно сферическая, однако, также встречались частицы неправильной формы или имеющие несколько билипидных слоев.

Результаты проточной цитометрии, коррелирующие с результатами флуориметрии, позволили заключить, что экстраклеточные везикулы, выделенные из микроводорослей хлореллы и хламидомонады, эффективно доставляют экзогенный белок к клеткам человека *in vitro*.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№121060200125-2).

РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМОГО КАРКАСА ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОЙ ЗУБНОЙ ПУЛЬПЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ЭНДОДОНТИИ

Супрун И.В., Запорожская-Абрамова Е.С., Мелконян К.И.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

supruniv@ksma.ru

Зубная пульпа является основным компонентом пульпо-дентинного комплекса, который служит защитной системой от травмы или инфекции зуба. Через кровеносные сосуды пульпа зуба обеспечивает его питательными веществами и содействует образованию дентина в случае повреждения тканей. Регенерационный потенциал зубной пульпы важен для восстановления как сформированных постоянных зубов, так и для поддержания развития несформированных. При традиционном лечении зуба очень часто удаляют его поражённую или инфицированную ткань и заменяют её инертными или синтетическими стоматологическими материалами. Однако такой подход может привести к потере биологической функции и прекращению развития корней несформированных постоянных зубов, что в конечном итоге приведёт к тому, что зуб станет восприимчивым к вторичным инфекциям, послеоперационным переломам и потеряет свои биологические функции. Поэтому одной из перспективных альтернатив традиционному лечению является применение децеллюляризованного каркаса зубной пульпы, который сохранит целостность внеклеточного матрикса, будет поддерживать рецеллюляризацию и, что особенно важно, способствовать дифференцировке стволовых клеток.

Цель данного исследования – разработка биосовместимого каркаса из децеллюляризованной зубной пульпы и оценка качества децеллюляризации, проведённой по двум разным методикам.

Третьи моляры, свободные от кариеса и реставраций, были отобраны у пациентов возрастом от 14 до 18 лет по ортодонтическим показателям. Зубы промывали раствором ФСБ и просушивали. Чтобы сохранить структурную целостность зубной пульпы экстирпацию проводили путём раскалывания зуба, после пульпу замораживали при -80°C . Детергентно-энзиматическая децеллюляризация пульпы осуществлялась по двум разным методикам. Согласно первой методике проводили последовательную обработку образцов пульпы зуба растворами Трипсин-Версена, 1% Тритона X-100, 4% дезоксихолата натрия, ФСБ и свиной панкреатической ДНКазы I 2000 ед. Во второй методике пульпа зуба подвергалась воздействию следующих реагентов: 0,05% Трипсин-ЭДТА, 3% Тритон X-100, 4% дезоксихолат натрия, 4% этанол и ФСБ. Выполнение каждой методики осуществлялось 20-24 часа. Для оценки качества децеллюляризации были проведены гистологические исследования путём окрашивания гематоксилин-эозином и количественное определение содержания ДНК как нативных, так и децеллюляризованных образцов.

Результаты гистологического исследования показали, что после выполнения децеллюляризации как по первой, так и по второй методике наблюдалось полное разрушение и вымывание ядерного материала с нарушением гистоархитектоники пульпы, но с сохранением её тканеспецифической структуры. Содержание ДНК в децеллюляризованных образцах составило не более 50 нг/мкг ткани, что соответствует качеству проведённых методик децеллюляризации.

Таким образом, мы получили сопоставимые результаты при использовании двух методик. Во второй методике предлагается заменить 3% Тритон X-100 на более щадящий детергент 1% Тритон X-100. Использование раствора ДНКазы оказалось экономически нецелесообразным. В дальнейшем оптимизация методик позволит использовать децеллюляризованную пульпу зуба в качестве биосовместимого каркаса в регенеративной эндодонтии.

АНАЛИЗ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ АЛМАЗА БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ ЛЁГКИХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЁЗА

Тарасова Е.К.¹, Масютин А.В.^{1,2}

¹Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

shaliotob@gmail.com

В целях преодоления лекарственной устойчивости терапия туберкулёза лёгких требует разработки новых технологий, в частности — создания конъюгатов наночастиц-носителей с лекарственным веществом для его адресной доставки в очаги инфекции. Эффективность данного подхода зависит от биосовместимости наноносителя и его биораспределения в организме. Потенциальным носителем лекарственных препаратов могут выступать модифицированные для биомедицинского применения наночастицы алмаза (НА), обладающие высокой биосовместимостью и широким спектром возможных модификаций. Тем не менее для успешного применения НА их биораспределение и дальнейшая судьба в организме малоизучены. Размеры НА и необходимость их идентификации в клетках требуют особого методологического подхода, включающего стандартную и аналитическую трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ). Цель работы – выявить НА медицинского применения в клетках лёгких мышей в норме и при экспериментальном туберкулёзе; охарактеризовать биораспределение НА методами стандартной и аналитической ТЭМ.

Для реализации цели исследования были разработаны критерии идентификации НА в биологических образцах путем инкубации с макрофагами человека THP-1. В работе использовали самок мышей линии BALB/c. Инфицирование *M. tuberculosis* (H37Rv) проводили аэрозольным способом в виварии ФГБНУ ЦНИИТ. Через 28 дней после инфицирования животным внутривенно вводили гидрозоль НА (4 мг/мл) в физиологическом растворе. Животных выводили из эксперимента через 7, 90, 180 суток. В лёгких мышей наночастицы выявляли методами электронной микроскопии, а также дифракции электронов.

В лёгких заражённых *M. tuberculosis* мышей через 28 дней вокруг бронхов и связанных с ними кровеносных сосудов формируются очаги воспаления площадью не более 7–12% гистологического среза. Через 90 дней площадь очагов возрастает (22–34%), они выявляются и субплеврально, появляются пенистые макрофаги. Через 180 дней очаги сливаются (55–60%) и формируются обширные области воспаления. В их составе много пенистых макрофагов, в том числе в стадии деструкции; также образуются зоны микронекрозов. В условиях

туберкулёзного воспаления через 7 суток после введения НА определяются в очагах (в макрофагах воспаления) и в интерстиции межальвеолярных перегородок (в гистиоцитах). Через 90 суток НА выявляются не только в гистиоцитах, но и в пенистых макрофагах, а также в альвеолярных макрофагах. НА при этом залегают не только в фагосомах, но и в жировых вакуолях. Через 180 суток НА наблюдаются как внутриклеточно в гистиоцитах, пенистых и альвеолярных макрофагах, так и внеклеточно из-за некротической гибели клеток. Для каждого наблюдения скоплений наночастиц была получена дифрактограмма, сопоставлением которой с эталонной дифрактограммой НА подтверждалась природа обнаруженных скоплений.

Таким образом, стабильная локализация НА в гистиоцитах и других макрофагах лёгких при туберкулёзном воспалении является ключевым свойством для использования НА как платформы для разработки новых противотуберкулёзных препаратов.

ТКАНЕВЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭФФЕКТОМ

Фетисова В.Э., Тетерина А.Ю., Комлев В.С.

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова, РАН, Москва, Россия

victoria.phetisova@yandex.ru

В современной медицинской практике часто встречаются хронические заболевания, в ходе которых на коже появляются незаживающие повреждения – язвы. На данный момент широко распространённым вариантом лечения трофических и диабетических язв является приём антибиотиков и наложение ранозаживляющих повязок. Однако в области на стыке материаловедения и медицины всё больше и больше внимания уделяется материалам для замещения кожных покровов, которые могли бы усовершенствовать такой подход к лечению.

К материалам для замещения кожных покровов применяются некоторые требования: они должны быть биологически совместимы с организмом человека, обладать скоростями резорбции, соответствующими скоростям роста новых тканей, достаточными механическими свойствами и частично выполнять функции кожных покровов. Требование к биологической совместимости обусловлено тем, что материалы не должны быть вызывать побочных эффектов, таких как цитотоксичность. Если скорость деградации таких материалов совпадёт со скоростью роста новых тканей, то материал постепенно биорезорбируется и не будет требоваться его смена на ране. Также требуются определённые механические характеристики материалов: они должны быть лёгкими, но при этом не хрупкими, чтобы их можно было закрепить на дефекте при лечении. При язвенных поражениях кожных покровов повреждается как эпидермис, так и дерма, поэтому требуется замещение обоих слоёв, что приведёт к более эффективному ранозаживлению. Для решения этой проблемы в данной работе были разработаны двухслойные материалы: нижний пористый слой выполняет функции дермы, а верхний плёночный – функции эпидермиса.

Основной целью данной работы было разработать материалы с антибактериальным эффектом. Поскольку при язвах регенеративный потенциал организма низок, то в самих дефектах кожных покровов зачастую присутствуют микроорганизмы. В данной работе предлагается применение антибактериальных веществ локально методом введения их в

двухслойные матрицы. Таким образом можно снизить нагрузку на организм, применяя антибактериальные препараты только в месте дефектов, а также за счёт пролонгированного выхода антибактериальных препаратов.

В данной работе разработаны двухслойные материалы на основе альгината натрия с пористым нижним слоем и плёночным верхним. Нижний пористый слой был функционализирован различными антибактериальными препаратами: цефотаксимом, линкомицином, гентамицином и ванкомицином в концентрации 50 мг/мл. В ходе работы была выявлена закономерность влияния химического строения препарата на механические, структурные, физико-химические и биологические характеристики материалов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (проект №МК-4573.2022.1.3).

РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТА БИМЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ: ЭРГОНОМИЧНОЙ ПОДСТАВКИ-ПОДЛОКОТНИКА ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ЛАМПЫ

Фролов Е.М.

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Волгоград, Россия

gamegagarin@mail.ru

Эргономичная подставка-подлокотник (ПП) для специалиста, работающего со щелевой лампой (ЩЛ), позволяет держать руку неподвижно, стабилизирует предплечье и кисть во время биомикроскопии глазного дна, гониоскопии или лазерной хирургии. Такая ПП не входит в комплектацию ЩЛ и не выпускается в РФ.

Цель работы – разработка и изготовление опытной модели устройства ПП, применяемого в медицинской практике (существуют зарубежные аналоги).

I этап работы включал информационный поиск устройства моделей ПП и получение экспертного мнения врачей-офтальмологов по потребности в ПП и его характеристиках. Устройство востребовано, часть врачей применяет подлокотники разной конструкции и из разных материалов (в т.ч. изготовленные кустарным способом). Требования – полужесткая площадка для локтя, обтекаемость форм, возможность обработки стандартными дезинфицирующими растворами, хорошее сцепление с гладкой поверхностью стола, отсутствие резкого запаха пластика, возможность подбора высоты подставки от 4 до 16 см.

II этап включал выбор типа ПП, ее доработка, создание 3D-модели и изготовление прототипа методом 3D-печати. Выбрана наборная форма – 4 элемента, позволяющие в сборе получать высоту 4-16 см, треугольного сечения с округленными краями, сквозным отверстием и выступами для зацепов при вертикальной установке подставки. Далее была изготовлена силиконовая форма с последующей отливкой первичной модели из полиуретана 3-х вариантов – с твердостью по Шору А 20, 25 и 30.

На III этапе получено экспертное мнение о полученном ПП, с последующим пилотным испытанием в условиях офтальмологической клиники. Эксперты одобрили общее решение, выбрав вариант с твердостью по Шору А 20.

Заключение. Разработки медицинских изделий и изделий, применяемых в процессе биомедицинских исследований, актуальны в качестве инновационных решений, в том числе в рамках импортзамещения. Выполненная работа важна как научное исследование, как решение практической задачи по заявке специалистов-практиков, и как (при продолжении работы) проект по созданию наукоемкого процесса полного цикла, объединяющего разработку устройств для биомедицинских исследований, их сертификацию и, в дальнейшем, мелкосерийное производство.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДОСТАВКИ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ *IN VIVO* НА МОДЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Фролова Г.А., Авдошина Д.В., Гордейчук И.В., Беликова-Исагулянц М.Г.

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

frolova.g.a.97@yandex.ru

Одной из проблем ДНК-вакцин является сложность их доставки *in vivo*. Существует ряд способов доставки, включая электропорацию и сонопорацию. Электропорация травматична и вызывает ожоги, что снижает перспективы клинического использования этого метода доставки. В отличие от электропорации, сонопорация неинвазивна и не травматична, однако требует подбора параметров ультразвука (УЗ) для эффективной трансфекции клеток *in vivo*. Целью данной работы являлась оптимизация условий доставки плазмиды как модели ДНК-вакцинного конструктора методом сонопорации *in vivo* на модели лабораторных мышей.

Был проведен обзор литературы для выявления параметров, определяющих эффективность сонопорации, получено препаративное количество плазмиды с репортерным геном люциферазы светлячка pVAXLuc2. Раствор плазмиды вводился внутрикожно группам мышей линии BALB/c (n=3-5) с последующей сонопорацией (Chattanooga INTELECT Mobile Ultrasound, Япония) в режимах, выбранных на основании анализа литературы. Контрольные мыши получали pVAXLuc2 без сонопорации. Эффективность трансфекции оценивали по интенсивности биолюминесцентного сигнала от участка введения плазмиды на приборе In Vivo Imaging System (IVIS Lumina, Perkin Elmer).

На первом этапе работы было проверено влияние увеличения интенсивности УЗ на эффективность трансфекции и воспроизводимость результатов при фиксированных параметрах (частота УЗ 1 МГц, импульсный режим, частота повторения импульсов 16 Гц, длительность импульса 1 мс и время воздействия 3 сек). Мы обнаружили, что при длительности импульса 1 мс, времени воздействия 3 сек и интенсивности 2,4 Вт/см² наблюдается улучшение проникновения плазмиды в клетки по сравнению с контрольной группой.

Ранее было показано, что при разных сочетаниях длительности «импульсного» воздействия при изменении интенсивности УЗ и количества УЗ-импульсов меняется динамическое поведение микропузырьков, что оказывает влияние на мембраны клеток, позволяя оптимизировать процесс УЗ-доставки. Поэтому, на втором этапе, мы сочетали

оптимальную интенсивность УЗ (2.4 Вт/см²) с различными длительностями импульсов (1 мс, 2 мс). Было показано, что к улучшению доставки плазмиды приводят только короткие 1 мс импульсы.

Таким образом, оптимальными для доставки плазмидной ДНК лабораторным мышам методом сонопорации являются частота УЗ 1 МГц, длительность импульса 1 мс и интенсивность 2,4 Вт/см².

Финансирование работы проводилось из средств Государственного задания по теме № 308 «Изучение факторов, определяющих направление развития иммунного ответа и патогенеза при вирусных инфекциях».

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПРОЦЕССЕ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ КОРОВ IN VITRO НА ИХ СПОСОБНОСТЬ К ЭМБРИОНАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ ПОСЛЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ

Цындрина Е.В., Сингина Г.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Подольск,
Московская область, Россия

kiril04kina@yandex.ru

Экстракорпоральное созревание (*in vitro maturation*, IVM) — важный этап получения эмбрионов млекопитающих *in vitro*. Условия среды, окружающей ооциты вне организма, критически влияют на качество яйцеклеток, что делает эти условия объектом направленного воздействия. В настоящем исследовании проведено сравнение двух сред IVM и изучено их влияние на завершение ооцитами ядерного созревания, а также на развитие и качество партеногенетических эмбрионов у овец. Выделенные *post mortem* из фолликулов яичников половозрелых овец ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) культивировали с целью созревания либо в среде ТС-199, дополненной 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 10 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), 10 мкг/мл лютеонизирующего гормона (ЛГ) и 20 нг/мл эпидермального фактора роста (ЭФР) (n=97, Система 1) либо коммерческой среде ВО-IVM фирмы IVF Bioscience (n=104, Система 2). Через 22 часа IVM ооциты освобождали от клеток кумулюса посредством инкубации ОКК в 0,1 % растворе гиалуронидазы, последующей дезагрегации комплексов пипетированием и многократного промыва изолированных яйцеклеток. В процессе последнего промыва ооцитов проводили их морфологическую оценку, отбирая клетки с первым полярным тельцем (ППТ). Ооциты с ППТ искусственно активировали в присутствии 5 мМ иономицина (5 минут), после чего культивировали в течение 4 часов с 2 мМ 6-диметиламинопурином и 10 мкг/мл циклогексимида в среде CR1aa. После окончания данного периода ооциты переносили в свежую среду CR1aa для дальнейшего эмбрионального развития. Через 3-е суток после активации оценивали число раздробившихся ооцитов, на 7-й день количество эмбрионов развившихся до стадии бластоцисты, а также определяли число ядер в эмбрионах с помощью цитологического анализа. Всего было проведено 4 независимых эксперимента. Данные обрабатывали однофакторным дисперсионным анализом. Для оценки достоверности различий между сравниваемыми средними значениями использовали критерий Тьюки.

Морфологический анализ не обнаружил влияния среды IVM на завершение ядерного созревания в яйцеклетках. Доля созревших ооцитов как отношение числа ооцитов с ППТ к исходному числу ОКК, существенно не различалась между исследуемыми вариантами и составила для Систем 1 и 2 соответственно $81,2 \pm 2,9$ и $79,6 \pm 3,3$ %. Также не выявлено значимого влияния условий созревания ооцитов на их способность формировать эмбрионы после искусственной активации. Доля дробления ооцитов в Системе 1 была равна $88,5 \pm 0,5$ % и для Системы 2 – $94,1 \pm 3,2$ %. Тем не менее, выявлено влияние тестируемых условий на способность партеногенетических эмбрионов преодолевать 8-16 клеточный блок развития. Доля эмбрионов, содержащих к 7-му дню культивирования менее 16-ти ядер, в Системе 1 была более низкой и составляла $34,7 \pm 3,7$ %. Созревание ооцитов в Системе 2 достоверно повышало данный уровень ($p < 0,05$). Развитие активированных ооцитов до стадии бластоцисты также зависело от условий их созревания *in vitro*. В случае IVM в Системе 1 доля развития бластоцист составила $20,5 \pm 1,2$ % и была существенно выше, чем в Системе 2 ($13,2 \pm 1,7$ %, $p < 0,05$), при этом качество полученных бластоцист, определяемое по содержанию в них ядер, не выявлено между системами. Сделан вывод о том, что среда ТС-199, дополненная 10 % ФБС, 10 мкг/мл ФСГ и ЛГ, а также 20 нг/мл ЭФР более оптимальна на этапе IVM ооцитов овец, при получении партеногенетических эмбрионов, чем коммерческая среда ВО-IVM.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (тема 0445-2021-0004).

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО НЕРВА КРЫСЫ

Чупрынин Г.П., Мелконян К.И., Асякина А.С., Козлова А.А.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

chupryningp@ksma.ru

Нарушение функциональности и целостности периферического нерва относится к числу распространённых причин инвалидизации, связанных с неврологическими расстройствами, оказывающих серьёзный психологический и физиологический дискомфорт, в силу частого развития нетрудоспособности и ограниченной двигательной функциональности у пострадавших людей. Перспективным методом получения имплантата, подходящего для лечения повреждения нервной ткани является децеллюляризация. Данный метод обработки позволяет удалить клеточный компонент, сохранив при этом естественную структуру внеклеточного матрикса, что способствует миграции клеток реципиента, и снижает иммунный ответ при имплантации, уменьшая тем самым вероятность отторжения.

Целью данного исследования была оценка динамики регенерации поврежденного нерва у крысы после имплантации децеллюляризованного нерва в динамике через 90 и 150 суток.

Исследование было проведено на крысах породы Wistar, массой 180-200 г возрастом 3 месяца ($n=4$). В наркоз вводили инъекцией 8 мг/кг золазепам и 8 мг/кг тилетамина (Золетил 100, Virbac, США). После операции всем крысам проводили инъекции антибиотика цефовецина 6,4 мг/кг (Zoetis, США) и кетопрофена 12,8 мг/кг (Вик-здоровье животных, Беларусь). Экспериментальным животным моделировали дефект седалищного нерва

размером 1 см, после чего имплантировали децеллюляризованный нерв крысы, полученный детергентно-энзиматическим способом. Гистологическое окрашивание образцов было проведено гематоксилин-эозином.

Анализ гистологических образцов показал, что через 90 суток после имплантации ацеллюлярного нерва препарат характеризовался умеренным содержанием визуально неповрежденных нервных волокон. Волокна имели диаметр 10,1 [8,2; 12,4] мкм, а в 1 мм² ткани располагалось 835,6 [804,2; 866,0] волокон, пространство между которыми было заполнено рыхлым эндоневрием. На 150-е сутки после операции количество нервных волокон визуально было значительно выше, чем в предыдущей группе, а диаметр волокон составил 10,4 [9,2; 11,0] мкм. Плотность расположения волокон составила 1366,0 [1291,3; 1404,6] штук на 1 мм². Количество рыхлой соединительной ткани между отдельными волокнами было меньше, чем в препаратах из предыдущей группы, в то же время вокруг пучка волокон сформировался выраженный периневрий. Образцы нативного нерва содержали 1284,1 [1190,5; 1316,0] волокон в 1 мм² поперечного среза, а диаметр волокон составил 10,2 [9,7; 11,0] мкм. Между отдельными волокнами содержалось небольшое количество рыхлого эндоневрия. Периневрий был представлен тонким слоем плотной соединительной ткани.

В результате проведенного эксперимента была выявлена положительная динамика репаративных процессов, отмечалось, что в образцах, взятых на 150-е сутки, количество нервных волокон на мм² соответствовало значениям нативного нерва.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России в рамках научного проекта № МФИ-П-20.1/47.

АРХИТЕКТУРА И ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГЕНТИНГТОНА

**Чуркина А.С.^{1,2}, Паско В.И.³, Беликова Л.Д.^{2,4}, Богомазова А.Н.^{4,5},
Лагарькова М.А.^{4,5}, Алиева И.Б.^{1,5}**

¹НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Биологический Факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴Федеральный научный клинический центр физико-химической медицины
им. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁵Центр точного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины,
Федеральный научный клинический центр физико-химической медицины
им. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

eva8326@yandex.ru

Болезнь Гентингтона (HD) является нейродегенеративным заболеванием и развивается как следствие полиглутаминовой мутации в гене белка гентингина (НТТ). Показано, что НТТ участвует в разнообразных клеточных процессах, в том числе в клеточном транспорте и эндоцитозе. В эти процессы вовлечены микротрубочки (МТ), являющиеся потенциальной мишенью при развитии данной патологии. МТ полимеризуются из тубулина, обладают полярностью, динамическими свойствами, функционируют как «рельсы» для

внутриклеточного транспорта, опосредованного моторными белками. Нарушения в динамике МТ и архитектуре их сети сопровождают многие заболевания, в том числе нейродегенеративные, что мотивировало нас на исследование их исследование у пациентов с HD.

В работе мы использовали фибробласты, выделенные из биоптатов кожи пациентов с HD с различной длиной полиглутаминового фрагмента в белке НТТ, и соответствующих им по возрасту здоровых доноров. Кроме того, мы анализировали нейроны и глиальные клетки, полученные методом направленной дифференцировки из ИПСК пациентов с HD и здоровых доноров. Для исследования динамических свойств МТ был использован метод трансфекции флуоресцентно-меченным плюс-концевым белком EB3-GFP, который позволил наблюдать за ростом и разборкой плюс-концов МТ в режиме реального времени. Далее динамику МТ анализировали в автоматическом режиме, используя собственные скрипты и плагины программы ImageJ, и методом ручного трассирования, который в условиях наших экспериментов давал наименьшую ошибку измерений. Динамику МТ исследовали в различных областях клетки: в центральной части (в области ядра и centrosомы), на ведущем крае и в хвосте фибробластов; в аксонах и дендритах нейронов. Также была проанализирована динамика восстановления сети МТ после ее разборки на холоде в фибробластах кожи. В этом случае измеряли количество растущих от centrosомы МТ, их длина, количество доходящих до края клетки МТ. Архитектуру сети МТ характеризовали по иммуноцитохимической окраске, сравнивая степень кривизны МТ, количество МТ, доходящих до края клетки, количество пионерских МТ. Полученные результаты позволили оценить *in vitro* различия в динамике и архитектуре сети МТ клеток HD-пациентов и здоровых доноров, что дает возможность описать влияние мутантного НТТ на свойства МТ.

Работа поддержана грантом № 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ (культивирование клеток), Программой Развития МГУ им. М. В. Ломоносова (PNR5.13) и Nikon Center of Excellence в НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ. им. М. В. Ломоносова.

АНАЛИЗ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА LL-37 НА КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Чутко А.Л.¹, Чернов А.Н.², Шарапов Я.А.³, Галимова Э.С.^{2,4}

¹Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,
Санкт-Петербург, Россия

chutko2401@gmail.com

Глиобластома (GBM) до сих пор является наиболее распространенной и опасной первичной опухолью головного мозга. Основной причиной неблагоприятных исходов GBM является высокая частота рецидивов опухоли, которая тесно связана с ее резистентностью к стандартным методам лечения. В этой связи существует крайняя необходимость в разработке

новых препаратов и эффективных подходов лечения. Недавние исследования показали, что антимикробный пептид LL-37 способен оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека. Цель данного исследования – изучить цитотоксическое действие LL-37 и его комбинаций с химиопрепаратами в отношении клеток глиомы человека U251 *in vitro*.

Культура клеток глиомы U251 человека получена из Российской коллекции клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург. Оценку цитотоксического действия химиопрепаратов и LL-37 на клетки глиомы U251 проводили с помощью МТТ-теста. Цитотоксическая активность LL-37 и химиопрепаратов на клетки GBM оценивалась по ИК₅₀ – дозе, вызывающей 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток. ИК₅₀ вычислялась методом нелинейного регрессионного анализа с помощью программы Origin Pro 8.5. Клетки GBM были обработаны LL-37 в концентрациях 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 мкМ. Дозы тестируемых химиопрепаратов – цисплатин: 1660, 830, 330, 166, 83, 33.2 мкМ; карбоплатин: 26900, 2690, 1350, 673, 269, 134 мкМ; доксорубин: 920, 460, 73.6, 36.8, 18.4, 7.36 мкМ; темозоломид: 15000, 5200, 1550, 773, 386, 155 мкМ; этопозид: 27, 13.5, 6.8, 3.4, 1.7, 0.8 мкМ. Были проведены три отдельных эксперимента.

При сравнении 50%-ингибирующей концентрации (ИК₅₀) LL-37 с ИК₅₀ химиопрепаратов установлено, что LL-37 обладает выраженным цитотоксическим действием на клетки глиомы U251 в МТТ-тесте (ИК₅₀ 1.9 мкМ). Также он эффективен с химиопрепаратами: карбоплатин (ИК₅₀ 3513 мкМ) и этопозид (ИК₅₀ 17.9 мкМ). Таким образом, по нашим предварительным результатам антимикробный пептид LL-37 оказывает противоопухолевый эффект в отношении клеток U251 *in vitro*, и может рассматриваться для разработки нового подхода в лечении GBM. В дальнейшем требуется провести дополнительные исследования для подтверждения полученных результатов.

Источник финансирования: исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2022-302 (20 апреля 2022 г.) НЦМУ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»).

АНАЛИЗ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ NGF И ЕГО КОМБИНАЦИЙ С ХИМИОПРЕПАРАТАМИ НА КЛЕТКИ ГЛИОМЫ U251

Шарапов Я.А.¹, Чернов А.Н.², Чутко А.Л.³, Галимова Э.С.^{2,4}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,

Санкт-Петербург, Россия

yarostloff@yandex.ru

Глиобластома – одна из самых злокачественных опухолей центральной нервной системы. Несмотря на достижения в методах лечения, она остается в значительной степени неизлечимой с медианой общей выживаемости пациентов 14–15 месяцев с момента постановки диагноза. Таким образом, возникает острая необходимость в разработке новых

препаратов и эффективных подходов лечения. В последние годы интенсивные исследования продемонстрировали, что NGF и его рецепторы играют важную роль в патогенезе рака человека и, следовательно, могут представлять собой новую терапевтическую мишень. Цель данного исследования – изучить цитотоксическое действие NGF и его комбинаций с химиопрепаратами в отношении клеток глиомы человека U251 *in vitro*.

Культура клеток глиомы U251 человека получена из Российской коллекции клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург. Оценку цитотоксического действия химиопрепаратов и NGF на клетки глиомы U251 проводили с помощью МТТ-теста. Для оценки цитотоксической активности NGF и химиопрепаратов на клетки GBM рассчитывали дозу, вызывающую 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток (ИК₅₀) методом нелинейного регрессионного анализа с помощью программы Origin Pro 8.5. Клетки GBM были обработаны NGF в концентрациях 0.23, 0.37, 0.94, 1.88, 3.7, and 7.5 нМ. Химиопрепараты тестировали в следующих дозах – цисплатин: 1660, 830, 330, 166, 83, 33.2 мкМ; карбоплатин: 26900, 2690, 1350, 673, 269, 134 мкМ; доксорубин: 920, 460, 73.6, 36.8, 18.4, 7.36 мкМ; темозоломид: 15000, 5200, 1550, 773, 386, 155 мкМ; этопозид: 27, 13.5, 6.8, 3.4, 1.7, 0.8 мкМ.

При сравнении ИК₅₀ NGF с ИК₅₀ химиопрепаратов установлено, что NGF обладает сильным цитотоксическим действием на клетки глиомы U251 как в монотерапии (ИК₅₀ 0.00214 мкМ), так и в комбинации с химиопрепаратами доксорубицином (ИК₅₀ 600.5 мкМ), карбоплатином (ИК₅₀ 2880.6 мкМ), цисплатином (ИК₅₀ 207.4 мкМ) и этопозидом (ИК₅₀ 13.7 мкМ). Таким образом, наши предварительные результаты демонстрируют противоопухолевый эффект NGF в отношении клеток U251 *in vitro*, и предполагают его преимущество для разработки нового подхода в лечении GBM. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения полученных результатов.

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО ВЕТА-1-ГЛИКОПРОТЕИН В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК (MDSC)

Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Заморина С.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской
Академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Shardinak@gmail.com

Трофобластический β -1-гликопротеин (ТБГ) – белок плаценты, обладающий плейотропными свойствами. Известно, что ТБГ обладает иммунорегуляторным потенциалом, например, увеличивает уровень Treg, усиливает продукцию IDO моноцитами и подавляет дифференцировку и пролиферацию Th17. Так, ТБГ является белком, способным подавлять иммунный ответ в отношении фетальных антигенов, следовательно, формирующих иммунную толерантность во время беременности. Целью нашего исследования была оценка влияния ТБГ на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток (MDSC), которые так же участвуют в формировании иммунной толерантности матери к плоду.

Для генерации MDSC *in vitro* мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) доноров выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³). Затем МПК (n=3) культивировали в 96-луночном планшете в концентрации

1×10^6 клеток/мл с GM-CSF («MiltenyiBiotec», Германия) в концентрации 20 нг/мл. После чего клетки инкубировали двое суток в CO₂ – инкубаторе при 5 % CO₂ и 37°C. После завершения первого этапа в культуры добавляли IL-1 β (20 нг/мл) («MiltenyiBiotec», Германия) и LPS (0,1 мкг/мл) (Sigma Aldrich, США). Спустя сутки в культуры вносили физиологические концентрации нативного ТБГ (1, 10 и 100 мкг/мл), затем клетки культивировали еще двое суток. После инкубации клеток с ТБГ оценивали дифференцировку MDSC и продукцию ими аргиназы-1 (ARG1) и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), определяющих их супрессивную активность.

Установлено, что нативный ТБГ (100 мкг/мл) увеличивал процент общего пула MDSC почти в 2 раза, а его более низкие концентрации не оказывали подобного эффекта. Низкие концентрации ТБГ (1 и 10 мкг/мл) продемонстрировали выраженный эффект увеличения субпопуляции M-MDSC (с 7,7 % до 30,35 и 29,39 % соответственно). Процент PMN-MDSC при этом не изменялся. В наших экспериментах нативный ТБГ не влиял на экспрессию ARG1 в MDSC, однако содержание IDO возросло с 20% до 40 % под действием ТБГ (1 мкг/мл) и до 55 % под действием ТБГ (100 мкг/мл).

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-25-00378.

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ В ОПУХОЛИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шевяков М.П.^{1,2}, Тюрин В. И.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия

shevmihail@icloud.com

Введение. Таргетная терапия является одним из самых перспективных методов в борьбе с опухолевым процессом. Актуальной задачей является поиск мишеней для назначения таргетных препаратов против конкретных мутаций. Рак поджелудочной железы – одна из самых неблагоприятных форм злокачественных новообразований с ограниченным числом терапевтических подходов. В нашем исследовании осуществлялся поиск ассоциированных с опухолью поджелудочной железы транслокаций с участием генов, кодирующих рецепторные тирозинкиназы. Данные рецепторы играют критическую роль в прогрессировании опухоли, активизируя сигнальные каскады клетки, ведущие к пролиферации и делению в ответ на различные факторы роста. Исследовались перестройки с участием генов *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*. Перестройки в данных генах являются наиболее клинически значимыми, так как для них разработаны эффективные таргетные препараты.

Материалы и методы. Коллекция из 118 образцов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), выделенных из опухолей поджелудочной железы, была протестирована на наличие указанных транслокаций методом обратнo-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Проводилась оценка дисбаланса экспрессии 5'- и 3'-регионов перестраиваемых генов, а также выполнялась вариант-специфическая ПЦР на распространенные варианты транслокаций.

Результаты исследования. В результате тестирования 118 образцов удалось выявить 3 положительных случая, демонстрирующих дисбаланс экспрессии перестраиваемых генов (2 случая *ALK* и 1 – *NTRK1*). С помощью вариант-специфической ПЦР была верифицирована транслокация *EML4-ALK (E13;A20)*, оставшиеся 2 случая содержали редкие химерные транскрипты, которые были идентифицированы с помощью таргетного NGS-исследования: *GCC2-ALK (G7;A20)*, *GP2-NTRK1 (G3;N8)*. Важно заметить, что в протестированных образцах практически не экспрессировались гены *ROS1* и *RET*, что дополнительно свидетельствует об отсутствии в них активирующих мутаций.

Заключение. Встречаемость *ALK*-транслокаций составила 1,69%, *NTRK1*-транслокаций 0,84%. Таким образом, пациентам с опухолью поджелудочной железы рекомендуется выполнение молекулярно-генетического тестирования транслокаций с участием генов *ALK* и *NTRK*. Обнаружение данных перестроек позволит назначить таргетную терапию, что обеспечит более благоприятный прогноз в отношении течения заболевания.

ЛИПОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫЕ КОМПОНЕНТЫ: НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Шилова Е.В., Колтаков И.А., Артюхов В.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Воронежский
государственный университет, Воронеж, Россия

zinkovae@list.ru

Одно из самых бурно развиваемых направлений современной нанотехнологии – тераностика, т.е. использование одного препарата одновременно как в диагностических, так и в терапевтических целях. Липосомы, содержащие в своём составе магнитоуправляемые компоненты, являются перспективным тераностическим средством, комбинируя диагностику и лечение за счёт инкапсулирования контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) вместе с терапевтическими средствами. В 2004 г. Brinkmann V. были открыты структуры, названные нейтрофильными внеклеточными ловушками (НВЛ), которые играют ключевую роль в патогенезе некоторых заболеваний. Среди таких заболеваний – фиброз цисты, преэклампсия, васкулит, псориаз, системная красная волчанка и другие заболевания, в том числе участие в метастазировании опухолевых клеток. Следовательно, НВЛ открывают широкие перспективы для их использования в качестве средства адресной доставки лекарственных препаратов. Целью наших исследований явилась разработка способа синтеза магнитоуправляемых липосомальных наночастиц для адресной доставки лекарственных препаратов к структурам НВЛ и изучение их действия на компоненты системы крови. В ходе работы были синтезированы магнитоуправляемые липосомы (фосфатидилхолин / холестерин / дистероилфосфоэтаноламин – полиэтиленгликоль – 2000 / антитела к гистону H3 / Fe₃O₄ – цетилтриметиламмония бромид). Были подобраны условия стандартизации размеров синтезируемых частиц, который после выбранного режима УЗ – обработки составил 176,4 ± 12,9 нм. Показано, что в случае отсутствия оболочки ПЭГ в составе липосом их агрегация происходит значительно быстрее, также происходит взаимодействие с иммунокомпетентными клетками, в частности, адсорбция на поверхности лимфоцитов и их

эндоцитоз. Установлено отсутствие токсических эффектов в отношении лимфоцитов крови человека, в отношении эритроцитов выявлено повреждающее действие на мембраны клеток самого магнетита и гемолитическое действие при соотношениях клетка/липосома = 1/1000.

Работа выполнена за счет Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ БИК-ОБЛУЧЕНИИ

Шубина С.С.^{1,2}, Антонова О.Ю.², Кочеткова О.Ю.²

¹Биотехнологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

shubina.sofa22@gmail.com

Мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы (ПЭМК) представляют собой перспективные микроносители для лечения различных заболеваний, таких как хроническое воспаление, онкология, диабет и другие. Преимуществом ПЭМК перед другими носителями можно считать большую ёмкость, универсальность при подборе инкапсулируемых соединений, а также возможность функционализации оболочки для направленной доставки. Инкапсулирование химиотерапевтических препаратов позволяет уменьшить эффекторную дозу, тем самым снижая системную токсичность.

Целью данной работы было определение оптимального соотношения термочувствительных компонентов микроконтейнера для эффективного высвобождения лекарственных соединений при БИК-облучении.

В результате исследования были получены стабильные микроконтейнеры, содержащие три слоя полиэлектролитов (РАН/PSS/РАН) и один слой липидов. Ранее сообщалось, что регулярная оболочка у микрокапсул формируется при шести и более полиэлектролитных слоях. По-видимому, данный эффект связан с наличием дополнительного липидного слоя, состоящего из смеси жирных кислот (лауриновая (LA) и стеариновая (SA)), лецитина и PEG. В липидный слой в качестве гидрофобного противоопухолевого соединения был включен доксорубин, а в полость ПЭМК в качестве гидрофильного лекарственного соединения путем копреципитации – лактоферин, который, как было показано, препятствует пролиферации и метастазированию меланомы.

Было определено оптимальное соотношение жирных кислот для эффективного разрушения ПЭМК при нагревании в 45°C, которое составило 3,5/1 (LA/SA). Для определения способности наночастиц Cu-BSA, инкапсулированных в ПЭМК, к нагреванию до необходимой температуры было проведено исследование внутриклеточного нагрева на культуре клеток меланомы мыши (B16F10). В результате при облучении ближним инфракрасным светом (808 нм, 3 W/cm² в течение 5 минут) максимальное увеличение температуры составило 14°C, что было достаточным для разрушения липидного слоя. При

этом изменение температуры зависело от концентрации ПЭМК в культуральной среде. Для визуализации выхода гидрофобного соединения из липидного слоя и последующего его поглощения клетками был использован флюоресцентный краситель RhodB. Было показано, что нагревание до 45°C в течение 30 минут способствовало увеличению выхода RhodB на 75% в сравнении с контролем.

Исследование цитотоксического действия инкапсулируемых соединений на клетки мышинной меланомы B16F10 показало, что выживаемость клеток на третьи сутки при инкубировании с доксорубицином (1 мкМ) и лактоферинем (150 мкМ) составляла 17% и 88% соответственно. При одновременном добавлении доксорубицина и лактоферина в тех же концентрациях выживаемость понизилась до 12%, что указывает на аддитивность их совместного действия (комбинационный индекс = 1). Помимо целевых соединений доксорубицина и лактоферина цитотоксический эффект также проявляли и наночастицы Cu-BSA. Инкубирование клеток с Cu-BSA (100 мкг на лунку) при БИК-облучении и без показало, что выживаемость на третьи сутки составляла 21% и 33% соответственно – разница в результатах связана с наличием эффекта термоабляции в первом случае, который является основой в фототермической терапии меланомы.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Шувалова М.Л.^{1,2}, Носов Г.А.^{1,3}, Мощенко А.А.³, Лебедева О.С.⁴, Белоусов В.В.³

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

²Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

⁴Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва, Россия

Margarita22zelenslaya@gmail.com

Генная терапия является перспективным способом лечения заболеваний ЦНС, однако из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) поступление в мозг генотерапевтических агентов может быть ограничено. В связи с этим является важным использование систем для контроля эффективности преодоления ими ГЭБ. Аденоассоциированные вирусы (AAV) считаются перспективным средством для генной терапии ЦНС, поскольку они безопасны, эффективны в трансдукции клеток и способны обеспечивать долгосрочную экспрессию трансгена. Для генной терапии используют несколько природных и искусственных серотипов AAV. В данной работе сравнили способность преодоления ГЭБ человека и мыши природным серотипом AAV9 и искусственным серотипом AAV9-PhP.V, который специально разрабатывался для эффективного прохождения ГЭБ. В работе были использованы *in vitro* модели ГЭБ человека и мыши. Модели были сконструированы на основе культуральной вставки "Transwell" с применением клеточных линий, первичных культур и дифференцированных iPSC. Серотип AAV9 преодолевал модели ГЭБ человека и мыши с одинаковой эффективностью – 10-12% вирусных частиц (ВЧ). Серотип AAV9-PhP.V лучше преодолевал только ГЭБ мыши (15,5% ВЧ), но не человека (8,7% ВЧ). Межвидовые отличия в

проницаемости ГЭБ для серотипа AAV9-PhP.V могут объясняться тем, что этот вирус связывается с рецептором LY6A на поверхности эндотелия. Серотип AAV9-PhP.V был разработан на основе мышинной модели, где показывал высокую эффективность, однако у приматов рецептор LY6A отсутствует. В связи с этим использование данного серотипа для человека не представляется оправданным. Полученные данные будут учитываться при производстве AAV для генной терапии.

РЕКОМБИНАНТНАЯ ЛИНИЯ КЛЕТОК, ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД, ТРАНСПОРТИРУЮЩИЙ ОРГАНИЧЕСКИЕ АНИОНЫ OATP1B1

**Щулькин А.В., Сеидкулиева А.А., Рокунов Е.Д., Петров А.В., Ганина С.О.,
Коняхин Е.А., Ерохина П.Д.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России), Рязань, Россия

erokhina.pelageya96@yandex.ru

Введение. Полипептид, транспортирующий органические анионы (OATP) 1B1 (ген *SLCO1B1*) является членом SLC-суперсемейства белков-транспортёров, экспрессируется на базолатеральной мембране гепатоцитов и обуславливает проникновение различных эндо- и экзогенных соединений внутрь клеток, где происходит их биотрансформация или экскреция. Для оценки участия данного переносчика в транспорте лекарственных веществ необходима клеточная линия, селективно экспрессирующая OATP1B1. Поэтому целью данного исследования явилось создание подобной линии клеток.

Материалы и методы. Исследование было выполнено на клеточной линии НЕК293, не экспрессирующей OATP1B1. Ген *SLCO1B1* был получен путем синтеза и клонирован в вектор pEGFP-N1 по сайтам XhoI и HindIII в результате чего была получена плаزمида pEGFP-SLCO1B1. Поскольку флуоресцентный белок находился в той же рамке считывания, что и целевой белок, появление флуоресценции указывало на его экспрессию.

Трансфекцию проводили по методу липофекции с использованием реактива Lipofectamine™ 3000. Для получения стабильных клонов, экспрессирующих SLCO1B1, селекцию проводили с использованием сульфата G-418 (500 мкг/мл). Экспрессию гена *SLCO1B1* оценивали методом ПЦР-real time, образование белка OATP1B1 подтверждали методом вестерн-блот.

Наличие активности у OATP1B1 оценивали по проникновению в клетки его субстрата аторвастатина (1 мкМ), концентрацию которого в образцах лизатов клеток анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты. В результате трансфекции клеток НЕК293 плазмидой pEGFP-N1-SLCO1B1 получена стабильная клеточная линия НЕК293, содержащая химерный ген *SLCO1B1-pEGFP*. Была показана высокая экспрессия мРНК гена *SLCO1B1* и наличие белка OATP1B1 в созданной клеточной линии.

Проникновение субстрата OATP1B1 аторвастатина в трансфецированные клетки существенно превосходило его проникновение в интактные клетки и подавлялось ингибитором OATP1B1 рифампицином (100 мкМ). Полученные данные свидетельствуют об активности транспортера в созданной клеточной линии.

Выводы. Получена клеточная линия, гиперэкспрессирующая полипептид, транспортирующий органические анионы НЕК293-OATP1B1 и доказана активность данного транспортера.

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА КУР НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

Аксенов Р.Г., Никонов И.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

ubezhishe@bk.ru

Продукты промышленного птицеводства относятся к наиболее востребованным в экономически развитых странах. Эти продукты являются основным источником инфицирования людей кампилобактериями. У цыплят, выращенных в условиях промышленного птицеводства, отсутствует колонизационная резистентность кишечника в отношении комменсалов – *Campylobacter* spp. Эти микроорганизмы вызывают у человека диарею и многочисленные серьезные осложнения. Целью работы было изучение действия пробиотического препарата на микрофлору кишечника молодняка кур яичного направления продуктивности.

В работе использовали экспериментальный пробиотический препарат на основе штамма *Lactobacillus plantarum*. Опыт проводили на молодняке кур-несушек кросса «Хай-Лайн». В работе использовали методы зоотехнии, молекулярной биологии и биоинформатического анализа. Состав микробиома оценивали методом метагеномного mNGS-секвенирования с использованием секвенатора Ion S5™ System на 35 и 56 сутки выращивания. Статистическая обработка результатов и их визуализацию выполняли в программе MS Excel, Rstudio с использованием пакета *microbeR* и с помощью программного обеспечения Ion Reporter.

Было показано, что количество некультивируемых бактерий на протяжении всего периода выращивания молодняка кур составило от 25,3 до 44,2%. Ввод кормовой добавки на основе *L. plantarum* изменил структуру микробиома кишечника, снизив относительную численность некультивируемых фило типов бактерий.

Количество полезных целлюлозолитических микроорганизмов (эубактерий, руминококков, бактероидов и других) на протяжении всего периода выращивания молодняка кур было достаточно высоким. Количество данных микроорганизмов в варианте с применением кормовой добавки на 35 сутки выращивания, при использовании пробиотика и на 56 сутки содержания было значительно выше, чем в контрольных вариантах. Стоит отметить, что количество целлюлозолитиков в варианте с пробиотиком на основе молочнокислых бактерий было выше, чем в контрольном варианте.

Содержание полезных бацилл было в основном наибольшим в варианте с применением лактобацилл по сравнению с контрольным вариантом на протяжении всего периода выращивания молодняка кур-несушек и составило от 2,3 до 4,7%. Стоит отметить, что бациллы обладают значительной антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов.

Количество полезных бифидобактерий в варианте с применением препарата *L. plantarum* на 35 сутки выращивания и на 56 сутки выращивания было выше, чем в контрольном варианте. Стоит отметить, что бифидобактерии обладают значительной антимикробной активностью в отношении патогенов.

Таким образом, было установлено эффективное действие пробиотика на основе штамма *L. Plantarum* в отношении поддержания нормофлоры кишечника у молодняка кур-несушек.

Работа поддержана грантом ректора ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина на реализацию научного проекта 2022.MVA.S002 «Нутригеномное исследование кишечника кур: основа моделирования для оценки эффективности антимикробных кормовых добавок».

БАКТЕРИИ ДЕСТРУКТОРЫ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ РОДА *KOCURIA* ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОТОПОВ (г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Алеев В.С.^{1,2}, Пьянкова А.А.², Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

v1.vvv132@yandex.ru

Бактерии рода *Kocuria* (класс *Actinomycetes*, семейство *Micrococcaceae*) широко распространены в природе, в том числе в местах обитания, характеризующихся неблагоприятными факторами среды (засоление, разные уровни pH и др.). Среди представителей рода известны штаммы-деструкторы ароматических соединений – загрязнителей окружающей среды. Галоалкалотолерантные бактерии рода *Kocuria* могут быть перспективны для использования при биоремедиации засоленных/щелочных почв.

Цель работы – изучение галоалкалотолерантных штаммов-деструкторов бензойной кислоты (БК) рода *Kocuria*, выделенных из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (Пермский край). Для исследования отобрано 7 штаммов рода *Kocuria*, изолированных из донных отложений техногенного галощелочного водоема, соляной породы (карналлита), глины из соляной шахты, почвы около солеотвала, которые были способными к росту при концентрации NaCl до 150 г/л и pH от 6 до 10.

Все штаммы показали способность использовать БК в качестве единственного источника углерода и энергии при выращивании на минеральных средах Раймонда (МСР) с 30 г/л NaCl и Пфеннига (СПФ, pH 10.0) без соли и с 50 г/л NaCl. Штаммы *Kocuria* spp. 69-4 и СХР-13 были отобраны для ростового эксперимента. Рост штамма 69-4 достигал своего максимума (ОП₆₀₀ 0,3 о.е.) на 3 сутки на МСР и СПФ (без NaCl). Штамм СХР-13 показывал максимальный рост на обеих средах (ОП₆₀₀ 0,21 о.е.) на 7 сутки культивирования. Максимум роста (ОП₆₀₀ 0,2 о.е.) на СПФ (50 г/л NaCl) наблюдался на 7 сутки для штамма 69-4 и на 9 сутки для штамма СХР-13. Штаммы способны к росту на протокатеховой кислоте, предполагаемом промежуточном продукте деструкции БК.

У исследуемых штаммов был выявлен ключевой ген деструкции БК (*benA*), кодирующий бензоат 1,2-диоксигеназу.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS*,
IXODES PAVLOVSKYI И *DERMACENTOR RETICULATUS* ПРИРОДНЫХ
ПОПУЛЯЦИЙ ЮГА ТОМСКОГО ПРИОБЬЯ

Апанасевич М.В., Кириленко К.М., Коханенко А.А.

Национальный исследовательский Томский государственный университет
«НИ ТГУ», Томск, Россия

apanasevich_mv@mail.ru

Клещи *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* являются облигатными кровососущими эктопаразитами, и одними из компонентов очагов клещевых трансмиссивных инфекций – вирусных, бактериальных и протозойных. Используя метагеномное 16S профилирование, мы описали микробиом кишечника клещей трех видов: *I. pavlovskyi*, *I. persulcatus*, *D. reticulatus*. Секвенирование производилось на приборе MinION (OxfordNanopore). Биформатическую обработку проводили с использованием программ guppy, qcat, MinIONQC, EPI2ME. Оценка видового разнообразия и статистическая обработка данных проводилась с использованием программ R (пакет phyloseq, microbiome) и Past.

Изучение микробиома кишечника представляет особый интерес, так как именно в кишечнике происходит первый контакт клеща с инфекционным агентом и следовательно он в большей степени ответственен за успешную колонизацию патогена и распространение в организме клеща.

В результате анализа микробиома кишечника показано, что наименьшее бактериальное разнообразие характерно для *D. reticulatus* (3 вида, рода и семейства), а наибольшее – для *I. persulcatus* (2572 вида, 354 рода и 112 семейств) и *I. pavlovskyi* (2352 вида, 414 родов, 107 семейств). Преобладающим видом у *D. reticulatus* является *Francisella persica*, у *I. persulcatus* – *Haemophilus piscium* и у *I. pavlovskyi* – *Rickettsia bellii*. Для клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* характерно преобладание видов рода *Rickettsia*, один вид бактерии (*R. buchneri*) из которых, по литературным данным, является эндосимбионтом клеща *I. scapularis*. Эта бактерия ответственна за синтез питательных веществ, предотвращение колонизации трансвариальную передачу патогенных видов из семейства Rickettsiaceae.

В итоге показано, что микробиом кишечника трех видов клещей значительно отличается по-своему бактериальному разнообразию. В частности, микробиом клеща *D. reticulatus* менее разнообразен, а клещи видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* характеризуются более разнообразными микробиомами. Также показано, что несколько бактериальных таксонов образуют основную долю микробиома кишечника.

НАКОПЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ПОРФИРИНОВ В ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТКАХ
MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ МИКРОВЯЗКОСТИ
МЕМБРАН И НАРУШЕНИЮ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

**Багаева Д.И., Глигонов И.А., Демина Г.Р., Вострокнудова Г.Н., Капрельянц А.С.,
Савицкий А.П., Ворожцов Д.С., Шлеева М.О.**

Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

bagaeva115@mail.ru

Ранее нами было обнаружено накопление значительного количества свободных копро- и уропорфиринов в клетках *M. smegmatis* при переходе в состояние покоя. Эти порфирины находились во фракциях мембран покоящихся клеток в виде гидрофобных производных тетраметиловых эфиров. Мы предположили, что такое накопление может влиять на микровязкость мембран, а, следовательно, и на функционирование мембраносвязанных ферментов и белков. Чтобы проверить это предположение, мы измерили микровязкость мембран *M. smegmatis* в условиях, способствующих переходу клеток в состояние покоя, и при реактивации, а также изучили функционирование ферментов дыхательной цепи в зависимости от накопления метилированных порфиринов в мембранах микобактерий.

Для характеристики структурных изменений мембран *M. smegmatis* в различных физиологических состояниях исследовали микровязкость мембранного матрикса флуоресцентным зондом BODIPY FL C16с использованием линейно поляризованного луча пикосекундного лазера с длиной волны 504 нм. Эти эксперименты проводили на уровне отдельных клеток с использованием конфокального микроскопа, снабженного поляризационным устройством. Количество эндогенных порфиринов увеличивали путем внесения в среду роста предшественника в биосинтезе гема – 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК).

Анализ продемонстрировал явное увеличение анизотропии флуоресценции (а значит и микровязкости мембран) в клетках, выращенных в присутствии АЛК и содержащих в 2 раза больше эндогенных порфиринов. При реактивации покоящихся микобактерий в полностью жизнеспособные, активные клетки была обнаружена обратимость структурно-функциональных изменений. Было выявлено, что при неизменном количестве клеток, состава жирных кислот, активности дыхания, уровня транскрипции в течение 20 часов реактивации покоящихся форм *M. smegmatis* микровязкость мембран уменьшается между 4 и 8 ч от начала процедуры реактивации. В этот же период (8-12 ч) наблюдалось заметное снижение концентрации тетраметилового эфира копропорфирина в клетках, оцененной при помощи ВЭЖХ.

Функционирование дыхательной цепи оценивали по скорости потребления кислорода (активность всей цепи) и по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДФИ) (активность начального звена дыхательной цепи, включая дегидрогеназы и пул менахинонов). В каждом случае было установлено снижение дыхательной активности для мембран, полученных из бактерий, выращенных в присутствии АЛК и содержащих повышенную концентрацию тетраметилового эфира копропорфирина (4MeCP).

Таким образом, накопление 4MeCP в мембранах микобактерий приводит к увеличению микровязкости мембран и ингибированию ферментов дыхательной цепи, и, наоборот. Можно

предположить, что гидрофобные формы порфиринов встраиваются в зоны расположения миколовых кислот в клеточной оболочке, усиливая плотность и прочность их упаковки, стабилизируют и консервируют компоненты мембран, подготавливая их к переживанию неблагоприятных условий. При реактивации происходит довольно быстрое деметилирование мембранного порфирина с образованием копропорфирина, который может быстро утилизироваться в синтезе гема и гем-содержащих белков, например цитохромов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00324.

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ БРОМЕЛИНА ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА РАЗРУШАТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ

Байдамшина Д.Р.¹, Гончарова С.С.², Холявка М.Г.², Каюмов А.Р.¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Медико-биологический факультет, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

prosto-di@mail.ru

Pseudomonas aeruginosa и *Staphylococcus aureus* часто вызывают хронические и резистентные инфекции в значительной степени из-за их способности образовывать биопленки. Образование биопленки позволяет этим организмам противостоять антибактериальным воздействиям, в отличие от свободноживущих клеток бактерий.

В работе исследовали разрушение биопленок, образованных стафилококком золотистым и синегнойной палочкой бромелином как растворимым, так и иммобилизованным на производных хитозана.

Для этого в 24-х луночных планшетах выращивали бактерии в течение 48-часов до образования биопленки, после чего обрабатывали 3 или 24 часа раствором бромелина (0.1 и 0.5 мг/мл) или ферментом, иммобилизованным на водорастворимых производных хитозана – карбоксиметилхитозана, сульфат хитозана и ацетат хитозана. Количество гетерогенного фермента соответствовало 0.1 и 0.5 мг/мл растворимого фермента, а в качестве отрицательного контроля были взяты чистые носители в аналогичных концентрациях. Остаточные биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Растворимый бромелин разрушал биопленки, образованные как *P. aeruginosa*, так и *S. aureus*. Среди всех вариантов производных хитозана только карбоксиметилхитозан продемонстрировал соответствующие результаты, а бромелин иммобилизованный на карбоксиметилхитозане привел к значительному уменьшению биопленок обоих патогенов. Сульфат хитозана и ацетат хитозан в обеих формах приводили к ложноотрицательным результатам, по-видимому, из-за неспецифического прилипания на поверхности планшетов.

Таким образом, иммобилизованный бромелин на карбоксиметилхитозане может применяться для разрушения бактериальных биопленок.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ-21-74-20053.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПУТИ БИОСИНТЕЗА ГЛИКОЛИПИДОВ ШТАММА *PSEUDOMONAS* SP. VD9

**Баукова А.С.¹, Французова Е.Э.², Ветрова А.А.²,
Позднякова-Филатова И.Ю.², Делеган Я.А.²**

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

baukova_26@mail.ru

К настоящему времени накоплен большой объем информации о способности бактерий утилизировать сложные органические поллютанты. Это позволяет использовать микроорганизмы разных таксономических групп в мероприятиях по восстановлению загрязнённых грунтовых и водных экосистем. Для повышения биодоступности потенциальных субстратов микроорганизмы-деструкторы гидрофобных соединений могут продуцировать в среду культивирования вторичные метаболиты амфипатической структуры.

Штамм *Pseudomonas* sp. VD9, выделенный из нефтезагрязнённого грунта Самотлорского нефтяного месторождения Нижневартовского района Ханты-Мансийского автономного округа, способен утилизировать декан, нафталин и дизельное топливо. Штамм может быть использован в мероприятиях по восстановлению загрязнённых грунтов в качестве деструктора углеводородов алифатической и ароматической структуры.

Целью работы является изучение генетической организации пути биосинтеза гликолипидов у штамма *Pseudomonas* sp. VD9.

Геном штамма представлен единственной хромосомой размером 7 147 452 п.н. (ГЦ% 60.4). На данный момент не представляется возможным определить видовую принадлежность штамма, поскольку значение параметра DDH штамма VD9 с типовыми штаммами ни одного из родственных видов: *Pseudomonas grimontii*, *Ps. marinalis*, *Ps. veronii*, *Ps. fildesensis*, *Ps. allii* не превышает порогового значения 70 %. В геноме штамма VD9 выявлены гены, которые могут быть вовлечены в продукцию вторичных метаболитов – гликолипидов (предположительно, рамнолипидов): оперон *rmlBDAC*, который кодирует ферменты, участвующие в превращении глюкозо-1-фосфат в тимидиндифосфат-L-рамнозу, являющуюся предшественником рамнолипидов и отдельно стоящий ген *wbbL*, кодирующий рамнозилтрансферазу *WbbL*. Для определения изменения количества мРНК целевых генов были разработаны специфические праймеры и проведена количественная ПЦР, дополненная реакцией обратной транскрипции. мРНК всех исследуемых генов была обнаружена во всех образцах, количество мРНК не изменилось в зависимости от условий культивирования клеток (с деканом и ацетатом калия).

Таким образом, на данный момент можно предполагать, что путь биосинтеза рамнозы в штамме активен вне зависимости от источника углевода.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ НА НАЛИЧИЕ *CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI*

Башкирова И.Г., Каримова Е.В.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, г.о. Раменский, Россия

bashkirova@mail.ru

Candidatus Phytoplasma solani (*Ca. P. solani*) принадлежит к классу Mollicutes. Фитоплазма поражает более 100 видов растений, включая многие сельскохозяйственные, декоративные культуры и дикие/травянистые виды. Среди часто поражаемых растений-хозяев – представители из семейств Пасленовые (*Solanaceae*), Астровые (*Asteraceae*), Зонтичные (*Apiaceae*) и др. Картофель (*Solanum tuberosum*) является одним из основных растений-хозяев фитоплазмы. *Ca. P. solani* вызывает болезнь «столбур» у культур из семейства Пасленовые. Фитоплазма имеет ограниченное распространение на территории Российской Федерации.

В работе проведен анализ растительного материала картофеля на наличие особо опасной фитоплазмы *Ca. P. solani*. Исследуемый биоматериал отобран в Волгоградской, Московской и Нижегородской областей. Выделение ДНК фитоплазмы проводили с использованием набора реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Диагностику фитоплазмы методом вложенной (nested) ПЦР осуществляли с использованием универсальных праймеров P1 (*Deng and Hiruki, 1991*)/P7 (*Schneider et al., 1995*) и fU5/rU3 (*Lorenz et al., 1995*). Праймеры P1/P7 использовали в качестве первого этапа вложенной ПЦР, а в качестве второго этапа вложенной ПЦР – универсальные праймеры fU5/rU3. Программу амплификации использовали в соответствии с Диагностическим протоколом РМ 7/62 (3)(ЕРРО, 2020). Для постановки ПЦР в режиме «реального времени» использовали коммерческую тест-систему «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» (ООО «Синтол», Россия) согласно прилагаемой инструкции.

Растительный материал из Волгоградской области проанализировали методом вложенной ПЦР на наличие фитоплазмы *Ca. P. solani*. Получен необходимый продукт амплификации размером 870 п.н. Образцы картофеля из Московской и Нижегородской областей были протестированы с помощью коммерческой тест-системы. Специфичная реакция осуществлялась по каналу флуоресценции FAM, а прохождение реакции ПЦР оценивалось по каналу HEX – внутренний положительный контроль. Полученные данные свидетельствовали об отсутствии патогена в растительных образцах картофеля.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Рег. № НИОКТР 122041400201-9.

ВЕРРУКОМИКРОБИИ ПОРЯДКА *METHYLACIDIPHILALES* ИЗ ТОРФЯНО-БОЛОТНЫХ
ПОЧВ ЯВЛЯЮТСЯ АЭРОБНЫМИ ГЕТЕРОТРОФАМИ И НЕ ОБЛАДАЮТ
СПОСОБНОСТЬЮ К МЕТАНОТРОФИИ

Бегматов Ш.А.¹, Иванова А.И.², Белецкий А.В.¹, Данилова О.В.², Куличевская И.С.²,
Марданов А.В.¹, Равин Н.В.¹, Дедыш С.Н.²

¹Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²Институт микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

shabegmatov@gmail.com

Метанотрофы порядка *Methylacidiphilales* филума *Verrucomicrobiota* известны как чрезвычайно ацидофильные автотрофные бактерии, обитающие в кислых геотермальных экосистемах. Вопрос о том, встречаются лиметанотрофные веррукомикробии в других биотопах с низким рН, остается открытым. Примечательно, что представителей порядка *Methylacidiphilales* часто обнаруживают по последовательностям генов 16S рРНК в образцах торфяно-болотных почв с повышенной кислотностью (рН 3.5–5.5).

В данной работе с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК мы проанализировали распространение различных линий *Verrucomicrobiota* в четырех кислых верховых болотах и шести низинных болотах с нейтральным рН, расположенных в Вологодской области. Последовательности гена 16S рРНК, имеющие 83–86% идентичность с ранее описанными метанотрофами порядка *Methylacidiphilales*, были детектированы в образцах торфа только из верховых болот. Проведенная лабораторная инкубация образцов торфа с метаном привела к увеличению относительной численности метанотрофных альфа-протеобактерий, в то время как доля *Methylacidiphilales* существенно не изменялась. В результате секвенирования метагенома одного из верховых болот было получено три генома представителей *Methylacidiphilales*. Анализ этих геномов не выявил генов, кодирующих ферменты, необходимые для окисления метана, и пути автотрофной фиксации углерода. Результаты анализа путей метаболизма показали, что обнаруженные нами *Methylacidiphilales* вероятно являются аэробными гетеротрофами, способными утилизировать некоторые сахара и растительные полисахариды. Филогенетические эти бактерии представляют некультивируемое кандидатное семейство UBA1321 порядка *Methylacidiphilales*, а не семейство *Methylacidiphilaceae*, в котором были обнаружены метанотрофы. Сравнительный геномный анализ *Methylacidiphilales* показал, что гены метан монооксигеназы и ферментов цикла Кальвина были горизонтально перенесены в *Methylacidiphilaceae* и отсутствуют в геномах бактерий из других семейств порядка *Methylacidiphilales*. Таким образом, большинство представителей *Methylacidiphilales* являются ацидофильными гетеротрофами, а *Methylacidiphilaceae* эволюционировали как группа, специализирующаяся на использовании метана и других соединений, присутствующих в кислых геотермальных экосистемах.

Исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант 19-29-05059).

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОЙ МЕТИОНИН АМИНОПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИИ *THERMUS THERMOPHILUS*

**Быков В.В., Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Кудряшов Т.А.,
Вологжанникова А.А., Соколов А.С., Лаптева Ю.С.**

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

naggilan88@gmail.com

Удаление N-концевого иницирующего метионина (N-terminal methionine excision (NME)) из вновь синтезированной полипептидной цепи является одной из самых распространенных ко-/посттрансляционных модификаций белков, затрагивающей до 80% протеома. Роль NME до сих пор остается плохо изученной, однако этот процесс считается необходимым для правильной субклеточной локализации белков, основным источником разнообразия N-концевых аминокислот клеточных белков, осуществляет контроль продолжительности жизни белков, предшествует другим посттрансляционным модификациям, например, N-концевому ацетилированию, миристоилированию, метилированию белков и др. Удаление метионина из рекомбинантных белков часто имеет решающее значение для их активности, стабильности и функции.

Метионин аминокептидазы (МАП) – ферменты, катализирующие NME, различаются по субстратной специфичности, а эффективность NME ограничивается радиусом боковой цепи второго после метионина остатка.

Ввиду низкой термостабильности и ограниченной субстратной специфичности МАП *E. coli* актуальным является поиск гомологичных ферментов из экстремофильных организмов. В этой связи цель данной работы заключается в изучении свойств МАП бактерии *T. thermophilus*. До настоящего времени данные о трехмерной структуре фермента, его специфичности и физико-химических свойствах отсутствовали.

Ген *TTH_RS08450*, кодирующий предполагаемую метионин аминокептидазу бактерии *T. thermophilus* (ВКМ В-1605), клонирован в векторарЕТ-29 и рНUE. Белок Tth-МАП наработан в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищен до гомогенного состояния. Современными методами физической химии исследованы свойства Tth-МАП в апо-форме и в Co^{2+} -связанном состоянии. Методом динамического светорассеяния установлено, что Tth-МАП является мономером. Методом регистрации собственной флюоресценции исследованы середина теплового перехода фермента, рН-зависимая стабильность третичной структуры фермента, устойчивость к действию гуанидингидрохлорида.

Фермент Tth-МАП бактерии *T. thermophilus* может быть востребован в биотехнологии для удаления метионина из рекомбинантных белков и пептидов в условиях повышенных температур и присутствия денатурирующих веществ.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00563.

СОЗДАНИЕ МЕТОДАМИ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ШТАММА ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ, СПОСОБНОГО К ЯБЛОЧНО-МОЛОЧНОМУ БРОЖЕНИЮ

Васягин Е.А.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва, Россия

egor.vasyagin@gmail.com

В основе современного промышленного виноделия лежит использование стартовых культур специализированных винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Подавляющее большинство красных и некоторые белые вина получают путем двух последовательных стадий брожения – осуществляемого дрожжами винного брожения, и яблочно-молочного брожения (ЯМБ), осуществляемого молочнокислыми бактериями. Включение стадии ЯМБ в технологический цикл снижает кислотность вина и улучшает его букет. Однако молочнокислые бактерии, которые осуществляют ЯМБ, чувствительны к ингибирующим условиям винного брожения. Поэтому перспективным является создание дрожжевого штамма, который одновременно мог бы осуществлять как винное брожение, так и ЯМБ. Еще одной проблемой при производстве вина является накопление в нем этилкарбамата. Это вещество является канцерогеном и образуется во время брожения и хранения вина в результате спонтанной химической реакции этанола с карбамоильными соединениями, в основном мочевиной, выделяемой дрожжевыми клетками. Была поставлена цель создания отечественного штамма винных дрожжей со сниженным уровнем образования этилкарбамата и способного к ЯМБ.

В качестве объекта исследований в работе был использован винный штамм дрожжей *S. cerevisiae* I-328 из коллекции ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, который используется в промышленном виноделии. Этилкарбонат образуется из мочевины, поэтому снижение концентрации мочевины, опосредованно приведет к снижению содержания этилкарбоната в вине. Для снижения уровня этилкарбамата мы инактивировали ген *CAR1* аргиназы, образующий из аргинина мочевины и орнитин. Для придания дрожжевому штамму способности к ЯМБ, в его геном была интегрирована кассета экспрессии с генами малат-пермеазы и малолактического фермента, под контролем промоторов, активных на поздних стадиях брожения. Ген малат-пермеазы (*mae1*) был взят из дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, продукт этого гена осуществляет активный перенос яблочной кислоты внутрь дрожжевых клеток. Ген малолактического фермента был взят из молочнокислой бактерии *Oenococcus oeni*, этот фермент осуществляет декарбоксилирование L-яблочной кислоты до L-молочной кислоты и диоксида углерода. Данная кассета экспрессии ЯМБ была интегрирована в геном дрожжей вместо гена аргиназы *CAR1* в результате CRISPR/Cas9 – опосредованной гомологичной рекомбинации. Отсутствие в геноме триплоидного штамма всех копий гена *CAR1* и наличие кассеты ЯМБ было подтверждено полногеномным секвенированием. В условиях микровиноделия было показано, что использование сконструированного штамма дрожжей приводит к снижению содержания в вине яблочной кислоты и увеличению молочной, по сравнению с исходным штаммом. Полученный штамм дрожжей является перспективным для совершенствования отечественных технологий виноделия.

Работа поддержана Минобрнауки России в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1071 от 20.09.2021 г.).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ШТАММА *DELFTIA* *TSURUHATENSIS* ULWDIS3 – ДЕСТРУКТОРА НАФТАЛИНА

Вершинина Д.Д.^{1,2}, Ветрова А.А.¹, Делеган Я.А.¹, Сазонова О.И.¹

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

dina-20002001@mail.ru

Штамм *Delftia tsuruhatensis* ULwDis3 был выделен из морской воды Финского залива Балтийского моря, отобранной близ порта Усть-Луга (Россия). Он характеризуется способностью утилизировать нафталин и дизельное топливо. Ранее было установлено наличие в геноме штамма последовательностей генов большой субъединицы нафталин-1,2-диоксигеназы, *nahAc*, и большой субъединицы салицилат-5-гидроксилазы, *nagG*.

Для определения геномной последовательности штамма *D. tsuruhatensis* ULwDis3 и идентификации генов, отвечающих за деградацию нафталина и салицилата, проводилось секвенирование геномной ДНК с использованием секвенаторов Illumina NovaSeq 6000 (2 x 100) и MinION Nanopore. Считывания, полученные по технологиям Illumina и OxfordNanopore, использовались для гибридной сборки. Считывания Nanopore были отдельно собраны в контиги с помощью программы Flye, а считывания Illumina – с использованием SPAdes. Считывания Illumina использовались для исправления ошибок Nanopore с использованием программного обеспечения Bowtie и Pilon. Циркуляризация концов репликона была подтверждена концевым перекрытием.

Размер генома штамма *D. tsuruhatensis* ULwDis3 составляет 6 944 т.п.н. Собранный геном был аннотирован с помощью Prokka. Геном содержит 6404 белок-кодирующих последовательностей (CDS), 84 гена тРНК и 5 генов рРНК. Среднее значение G+C у генома *D. tsuruhatensis* ULwDis3 равно 66.5%, что согласуется с известными данными для вида *D. tsuruhatensis*. С помощью сервиса Kegg (BlastKOALA) провели анализ кластеров ортологичных генов. Из аннотированных 6404 белок-кодирующих последовательностей 3461 имеют определенное функциональное значение, а 2943 CDS относятся к гипотетическим белкам, чья функциональная роль требует более детального изучения.

Гены, необходимые для окисления нафталина через салицилат и гентизат (*nag*-гены) до интермедиатов Цикла Кребса, организованы в один оперон и расположены на участке размером 15,8 т.п.н. Структура катаболического оперона деградации нафталина у штамма ULwDis3 схожа с таковой штаммов *Ralstonia* sp. U2 и *Burkholderia* sp. BC1 за исключением отсутствия гена *nagN*, кодирующего белок с неопределённой функцией. Идентичность нуклеотидной последовательности данного региона штамма ULwDis3 с *nag*-генами штаммов *Ralstonia* sp. U2 и *Burkholderia* sp. BC1 составляет 99,9% и 97,2%, соответственно. Выше гена,

кодирующего редуктазный компонент нафталин-1,2-дигидрогеназы расположена открытая рамка считывания (ОРС), выведенная аминокислотная последовательность которой имеет 100% идентичность с последовательностью, кодирующей транскрипционный регулятор LysR типа в штамме *Ralstonia* sp. U2. Также, данная последовательность транскрибируется в противоположном направлении от *nag*-генов. В геноме штамма *D. tsuruhatensis* ULwDis3 обнаружены 3 ОРС, кодирующие гентизат-1,2-диоксигеназу. Одна из ОРС входит в состав *nag*-оперона. Роль остальных двух в деградации гентизата требует дальнейших исследований.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АЗИТРОМИЦИНУ В СОВРЕМЕННОЙ РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ *NEISSERIA GONORRHOEAE*

**Винокурова А.С., Кандинов И.Д., Шаскольский Б.Л., Горшкова С.А.,
Кравцов Д.В., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А.**

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

al.vinokurova14@gmail.com

В Российской Федерации азитромицин не применяется для лечения гонококковой инфекции, однако на протяжении последних нескольких лет наблюдается значительная доля резистентных к данному препарату штаммов *N. gonorrhoeae*. Динамика изменения устойчивых к азитромицину изолятов в общей популяции возбудителя, а также механизмы формирования резистентности остаются неизвестными.

Проведено исследование фенотипической чувствительности изолятов *N. gonorrhoeae* к азитромицину с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК_{Ази}) и установлением генетических детерминант, ассоциированных с устойчивостью к азитромицину. Всего проанализировано 162 клинических изолята *N. gonorrhoeae*, собранных в различных регионах Российской Федерации в 2020–2021 годах. 22 (13,6%) изолята оказались устойчивыми к азитромицину (МПК_{Ази} > 1–8 мг/л), 140 (86,4%) были чувствительными (МПК_{Ази} = 0,01–1,0 мг/л). У 160 изолятов обнаружены мутации в генах эффлюксной помпы MtrCDE, приводящие к аминокислотным заменам как в гене *mtrR* и его промоторной области, так и в гене *mtrD*. В ряде случаев увеличение экспрессии MtrCDE и, как следствие, формирование устойчивости к азитромицину (МПК_{Ази} ≈ 2 мг/л), было обусловлено мозаичным строением генов *mtrR* и/или *mtrD*.

Выявлено соответствие между различными аллелями генов *mtrR* и *mtrD*. Филогенетический анализ генов *mtrR* и *mtrD* позволил определить 25 клад, имеющих сцепленные *mtrR* и *mtrD* аллели, из них 7 клад включали от 5 до 20 изолятов и 18 клад по 2–4 изолята. Полученный результат показывает совместную эволюцию генов *mtrR* и *mtrD* у *N. gonorrhoeae*. Особо следует отметить кладу изолятов, имеющих сцепленные аллели *mtrR* 485 и *mtrD* 3353. Она включает 20 изолятов, в которых обнаружены нуклеотидные последовательности, по-видимому, возникшие в результате рекомбинации с геномом *N. meningitidis*, как в гене *mtrR*, включая его промоторную область, так и в гене *mtrD*. Такие изоляты характеризовались устойчивостью к азитромицину на уровне 1–4 мг/л.

Все изоляты *N. gonorrhoeae* анализируемой выборки были разделены на группы согласно генетическим профилям аллелей *mtrR* и *mtrD* и полиморфизмам оперона *rrn*. Мутации – 35delA, Ala39Thr, Ala86Thr, His105Tyr в генах *mtrR* (немозаичная аллель) присутствовали в фенотипически чувствительных к азитромицину группах изолятов. Обнаружено, что устойчивость к азитромицину внутри группы изолятов с медианным значением МПК_{Ази} = 2 мг/л ассоциирована с мозаичным промотором гена *mtrR*, а также с мутациями Ser821Ala, Lys823Glu в гене *mtrD* (мозаичная аллель). Наибольшее значение МПК_{Ази} = 4 мг/л наблюдалось в группе изолятов с заменой С2611Т во всех четырех аллелях гена 23S рНК.

Таким образом, формирование устойчивых к азитромицину изолятов в российской популяции гонококков и закрепление отдельного кластера резистентных штаммов, скорее всего, могут быть обусловлены несколькими причинами: (а) трансграничным переносом устойчивого изолята со специфическими генетическими детерминантами из-за рубежа, где такие формы уже встречаются повсеместно; (б) событиями рекомбинации геномов *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* с последующим закреплением в популяции мозаичных вариантов помпы эффлюкса *mtrCDE*, как неспецифичного механизма формирования устойчивости *N. gonorrhoeae* к азитромицину.

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ И НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БИОСЕНСОРОВ

Власенко Л.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» РАН, Оренбург, Россия

lv.efremova@yandex.ru

Бактериальные люминесцирующие биосенсоры (*lux*-биосенсоры) являются востребованным инструментом для решения широкого спектра задач в биологии, экологии и медицине. Использование *lux*-биосенсоров для исследования токсичности наночастиц (НЧ) – соединений размером от 1 до 100 нм определяется точностью, быстродействием и чувствительностью данных биотестов. Подобные исследования позволяют оценить степень опасности НЧ для живых систем, а также сформировать основу для разработки новых средств с антибактериальной активностью.

Целью работы явился анализ возможностей использования бактериальных *lux*-биосенсоров для оценки антибактериальной активности углеродных наноматериалов (УНМ) и наночастиц металлов.

В исследовании использованы два коммерчески доступных («Микробиосенсор В17-677F» и «Эколюм») и два лабораторных (*Escherichia coli* K12 MG1655 рXen7 и *Bacillus subtilis* EG168-1) штамма люминесцирующих бактерий с конститутивным типом свечения.

Установлено, что *lux*-биосенсоры на основе *Photobacterium phosphoreum*, *E. coli* и *B. subtilis* демонстрируют согласованный ответ на воздействие УНМ различной структуры в

тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции. При этом определены преимущества *lux*-биосенсоров на основе *E. coli* в сравнении с *P. phosphoreum*, а также показана перспектива повышения чувствительности биолюминесцентного биотестирования на *B. subtilis*. Наибольшая биологическая активность среди УНМ детектирована у оксида графена (3 класс токсичности – умеренно опасные вещества), функционализированных нановолокон и одностенных углеродных нанотрубок с COOH-группами (потенциально опасные соединения); среди НЧ наиболее токсичными оказались НЧ Cu (2 класс токсичности), MgO и CuO (3 класс токсичности). Совместное выполнение биолюминесцентного анализа и ростовых микробиологических тестов (с использованием *E. coli* K12 TG1 pF1 со встроенной кассетой *luxCDABE*-генов *V. fischeri*) позволило связать ингибирование свечения данного микроорганизма в присутствии УНМ с развитием бактерицидного эффекта.

Исследование выполнено по теме НИР № FNWZ 2022-0010.

ПЛАЗМОДИОФОРОЛ А – ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ

Гараева Д.И.¹, Смирнова Е.О.², Ланцова Н.В.², Топоркова Я.Ю.², Гречкин А.Н.²

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии
наук», Казань, Россия

garaeva.diana05@gmail.com

Липоксигеназный каскад является источником окисленных производных полиненасыщенных жирных кислот – оксипинонов. Эти многофункциональные соединения широко распространены в организмах, принадлежащих разным таксонам. Ключевыми ферментами липоксигеназного каскада являются липоксигеназы и неклассические цитохромы P450 клана CYP74.

В геноме возбудителя килы капусты *Plasmodiophora brassicae* экспрессируются два гена, кодирующие цитохромы P450. Степень сходства данных последовательностей не позволяет отнести эти ферменты к семейству ферментов CYP74, однако особенности первичной структуры и механизмов каталитического действия, а также данные филогенетического анализа позволили объединить эти ферменты и семейство CYP74 в единый клан CYP74. ДНК одного из генов *Plasmodiophora brassicae* (CYP50918A1) была клонирована, и соответствующий белок был получен в клетках *E. coli* штамма Tuner(DE3)pLysS. Рекомбинантный фермент был очищен методом металлоаффинной хроматографии. Было показано, что предпочтительным субстратом для данного фермента является 13-гидроперекись α -линоленовой кислоты (13-ГПОТ). Фермент был охарактеризован как гидропероксидбициклаза, в результате функционирования которой образовывалось три типа бициклических оксипинонов, названных плазмодиофорами, основным из которых был плазмодиофорол А.

Ранее было показано, что некоторые оксипирины, в частности (ω 5Z)-этеролоновая кислота, обладает ярко выраженным антимикробным эффектом. В данной работе целью было проверить наличие антимикробных свойств у плазмодиофорол А.

В результате данной работы было показано, что в концентрации 0,5 мМ плазмодиофорол А оказывает стойкое бактериостатическое действие в течение первых 24 часов после добавления. Клетки *Bacillus subtilis* оказались наиболее чувствительными к действию плазмодиофорол А. На примере данного микроорганизма был поставлен эксперимент по определению динамики роста клеток в течение первых 12 часов. Было выявлено, что эффект от соединения с течением времени снижается, что может быть связано с его постепенным разрушением в водной среде.

Работа по получению рекомбинантного фермента СУР50918А1 поддержана грантом РФФИ проект № 21-14-00397. Исследование биологической активности плазмодиофорол А проводилось при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ МИКРОБИОТЫ ПОЧВЕННОЙ ОЛИГОХЕТЫ *EISENIA FETIDA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ИЛАХ ВОДООЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

**Гафарова Е.Р., Хабибулина В.Р., Согомонян К.С., Холостов Г.Д., Виноградов М.К.,
Вишняков А.Э., Гранович А.И.**

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

orhidea-palma@yandex.ru, st047483@student.spbu.ru

Вермикомпостирование – получение удобрений с помощью почвенных олигохет – это активно развивающаяся область агротехники. Полезные свойства вермикомпоста обеспечиваются бактериальными сообществами пищеварительной системы червя, которые перерабатывают поступающий субстрат. Особенно большое внимание уделяется способности червей и их симбиотических бактерий перерабатывать субстраты, представляющие собой органические отходы сельскохозяйственных или иных производств. Целью нашей работы стал анализ микробиоты почвенной олигохеты *Eisenia fetida* при культивировании на субстрате из ила, полученного с водоочистных сооружений. В качестве контроля использовался чистый торфяной субстрат. С помощью метагеномного секвенирования были проанализированы образцы кишечника червя, заполненного илом и контрольным субстратом, пустых кишечников после прохождения ила и контрольного субстрата, экскременты червей после культивирования в контрольном и экспериментальном субстрате, а также образцы ила и контрольного субстрата.

Анализ разнообразия показал, что представленность и таксономический состав сообществ бактерий в контрольных и экспериментальных образцах значительно различаются. При этом основу микробиоты всех образцов составляют бактерии фил Proteobacteria, Actinobacteriota и Firmicutes. В экспериментальных образцах разнообразие микробиома более выражено, а наиболее существенные отличия выявлены между сообществами бактерий пустого кишечника червя и илового субстрата. Заметные различия между экспериментальной и контрольной группой выражены в относительном обилии фил Patescibacteria,

Gemmatimonadota, Bacteroidota и Spirochaetota. Более того, обилие представителей Patescibacteria и Gemmatimonadota в кишечнике снижено по сравнению с иловым субстратом, а Bacteroidota особенно широко представлены в образцах контрольного субстрата. Бактерии Spirochaetota и Acidobacteriota обнаружены в контрольных и экспериментальных образцах кишечника, но не идентифицированы в илу или торфе, поэтому могут являться постоянной составляющей микробиоты *E. fetida*.

Таким образом, хотя основной состав бактериальных сообществ сходен, вклад различных фил в разнообразие существенно отличается как между контрольной и экспериментальной группами, так и между кишечником и субстратом, а также между заполненным и полным кишечником. Дальнейший функциональный анализ микробиома позволит определить конкретные рода бактерий, участвующие в переработке субстрата.

Данное исследование финансировалось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением No 075-15-2020-907 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидий из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен для государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

ПРИМЕНЕНИЕ ДВУГИБРИДНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ ДЕЛЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ SOS-ОТВЕТЕ

Голофеева Д.М., Румянцева Н.А., Ведяйкин А.Д.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

golofeevad@gmail.com

Бактериальная двугибридная система – эффективный метод качественной и количественной оценки межбелковых взаимодействий в живой клетке. В основе одной из вариаций данного метода лежит использование цАМФ-зависимого сигнального пути клетки. В штамм с удалённым геном *суаА* вносятся генетические конструкции, кодирующие два комплементарных фрагмента каталитического домена аденилатциклазы (*СуаА*) *Bordetella pertussis*, слитых с белками интереса. При взаимодействии белков интереса фрагменты *СуаА* оказываются в достаточной близости, что приводит к восстановлению функциональной активности целого фермента, и, следовательно, к восстановлению β-галактозидазной активности в клетке. Таким образом, измерив β-галактозидазную активность, можно количественно оценить взаимодействие белков в клетке.

Другая вариация данного метода – бимолекулярная флуоресцентная рекомбинация – позволяет оценить межбелковые взаимодействия по уровню флуоресценции в клетке. Аналогично предыдущему типу двугибридной системы, данный метод основан на принципе комплементации. Наличие флуоресценции в клетке в данном случае свидетельствует о достаточном сближении двух нефункциональных фрагментов флуоресцентного белка, слитых с взаимодействующими друг с другом белками интереса. Этот подход позволяет визуализировать степень взаимодействия белков в клетке и их локализацию.

В данной работе были изучены взаимодействия белков, которые вовлечены в процесс деления клетки *E. coli*. Белок FtsZ играет главную роль в данном процессе. Он способен взаимодействовать с целым комплексом белков, привлекая их в сайт деления и управляя их работой. Выяснение влияния на данные взаимодействия белка SulA при активации SOS-ответа является целью данного исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-24-00085.

ГАЛАКСИН-ПОДОБНЫЙ БЕЛОК В ТКАНЯХ УЛИТОК РОДА *LITTORINA* И ЕГО ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА

**Горохов И.А., Гафарова Е.Р., Мальцева А.Л., Курячий Д.С.,
Байазыт К.-Д.К., Гранович А.И.**

Санкт-Петербургский Государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных,
Санкт-Петербург, Россия

ivgor1004@mail.ru

Одна из функций антимикробных пептидов – регуляция ассоциированного микробиома многоклеточных животных, стабильность которого крайне важна для жизни организма хозяина. Симбиотические прокариоты влияют на обмен веществ многоклеточных, их развитие и адаптацию. В нашем исследовании моделью являются улитки рода *Littorina* и их взаимоотношения с ассоциированным микробиомом. На основе выявленных ранее закономерностей состава микробиомных сообществ кишечника и поверхности тела этих улиток можно предположить наличие регуляторных механизмов в исследуемой системе.

Для изучения природы и локализации регуляторов ассоциированного микробиома в исследуемой модели была произведена фиксация фрагментов органов улиток, заселенных бактериями (жаберные ткани, задний кишечник, проток половой системы). Экстракты этих тканей продемонстрировали антимикробную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Состав активных экстрактов был изучен с помощью ЖХ-МС/МС, среди компонентов экстрактов по молекулярным свойствам было выделено 6 пептидов-кандидатов, предположительно проявляющих антимикробную активность.

Один из пептидов-кандидатов – галаксин-подобный белок. Его ортологи встречаются у многих беспозвоночных и выполняют различные функции: участвуют в кальцификации экзоскелета кораллов *Galaxea fascicularis*, *Acropora millepora*, регулируют популяцию симбиотических бактерий *Vibrio fischeri* в световом органе кальмара *Euprymna scolopes*.

Для изучения возможных изменений в экспрессии галаксина при иммунном ответе было проведено экспериментальное ранение с заражением улиток рода *Littorina*. После 72 часов от начала эксперимента были отпрепарированы и зафиксированы различные части тела моллюсков для последующего выделения РНК и ОТ-ПЦР с праймерами к галаксину. Данные находятся на стадии обработки.

Проект выполняется при поддержке гранта РНФ 19-14-00321, рук. А.И. Гранович.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К АЗИТРОМИЦИНУ В СОВРЕМЕННОЙ РОССИЙСКОЙ И ЕВРОПЕЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИЯХ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ *NEISSERIA GONORRHOEAE*

**Горшкова С.А., Кандинов И.Д., Шаскольский Б.Л., Кравцов Д.В., Винокурова А.С.,
Дементьева Е.И., Грядунов Д.А.**

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

s.gorshkova13@gmail.com

Препаратом выбора для лечения гонореи в России является цефтриаксон, и, в отличие от европейских стран, азитромицин не используется. Тем не менее, в 2020/21 годах в России зарегистрирована существенная доля устойчивых к азитромицину изолятов: 16,8 % в 2020 г. и 9,3 % в 2021 г., что выше порогового значения в 5%, рекомендованного ВОЗ для исключения препарата из схем терапии гонореи.

Определение молекулярных детерминант, ассоциированных с устойчивостью к азитромицину в российских клинических изолятах *N. gonorrhoeae*, осуществляли с использованием сконструированных в данной работе олигонуклеотидных гидрогелевых микрочипов. Микрочип представлял собой пластиковую подложку с нанесенными на нее гидрогелевыми элементами, каждый из которых содержал иммобилизованный олигонуклеотидный зонд для гибридизации. Сконструированы специфичные зонды для идентификации мутаций в генах 23S рРНК (положение 2611), *mtrR* (положения 39, 45, 86, 105), *mtrD* (положения 821, 823), а также в позициях -10, -35 промоторного региона гена *mtrR*.

Исследовано 428 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в РФ в 2018-2021 гг. Все изоляты 2018 и 2019 г. были фенотипически чувствительны к азитромицину, несмотря на наличие некоторого количества замен в генах *mtrR* и *mtrD*. В то же время, обнаружено 17 изолятов, собранных в 2020 г. и 5 изолятов 2021 г., устойчивых к азитромицину, и обладающих мозаичными аллелями генов *mtrR* и *mtrD*. Так, среди изолятов 2021 г. 22,2 % несли мозаичные аллели гена *mtrR* и 33% – мозаичные аллели гена *mtrD*.

Традиционным методом молекулярного генотипирования *N. gonorrhoeae* является *Neisseria gonorrhoeae* Multi-Antigen Sequence Typing (NG-MAST), основанный на определении нуклеотидных последовательностей фрагментов двух гипервариабельных локусов, *porB* и *tbpB*. Согласно результатам генотипирования российских изолятов 2018-2021 гг. они принадлежали к 161 молекулярному (сиквенс) типу, из них выявлено 69 сиквенс-типов, которые также обнаруживались в Европе, и 92 уникальных российских молекулярных типа, в Европе не встречающихся. Филогенетический анализ показал, что в России и в Европе увеличивается число «пересекающихся» геногрупп, т.е. геногрупп, в которых присутствуют как европейские, так и российские сиквенс-типы, что может свидетельствовать о постепенном сближении двух популяций возбудителя гонококковой инфекции.

Третьей по распространенности в России оказалась геногруппа G12302 (30 изолятов, 7%), ранее не встречающаяся. Большая часть (13 из 17) устойчивых к азитромицину российских изолятов принадлежала геногруппе G12302. В настоящее время она является одной из самых распространенных в Европе, а также быстро растущей геногруппой, включающей существенную долю устойчивых к азитромицину изолятов. Таким образом,

можно предположить, что появление и рост штаммов геногруппы G12302 в России связаны с трансграничным переносом изолятов данной геногруппы из европейских стран. Наблюдаемый рост устойчивых изолятов уже в ближайшем будущем может поставить под угрозу применение актуальных антимикробных препаратов для терапии гонококковой инфекции.

БАКУЛОВИРУСНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН

Джапарова А.Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Россия

nastyadzh@mail.ru

Создание вакцин – это очень трудозатратный и длительный процесс, поэтому разрабатываются новые технологии получения вирусоподобных частиц в разных экспрессионных системах, таких как насекомые. **Бакуловирусная система экспрессии** – это метод, основанный на заражении клеток насекомых специальными вирусами со встроенным геномом нужного нам белка. Эти вирусы являются патогенами только для членистоногих и безопасны для других живых организмов. После заражения инфицированные клетки начинают синтезировать рекомбинантный белок. Применение метода медицинских исследованиях по созданию вакцин:

1. Вакцина против гриппа. Некоторые исследования доказали, что экспрессия нескольких определенных белков вирусов гриппа при экспрессии ведет к самосборке вирусоподобной частицы (ВПЧ) с отсутствием вирусного генома. Используемый вирус содержит гликопротеины гемагглютинин и нейраминидаза, поэтому необходима их совместная экспрессия или дополнительное введение одного из этих гликопротеинов, чтобы вирусоподобные частицы легко и эффективно высвобождались. Закодированный белок синтезируется в клетке в огромном количестве. Он может обеспечивать образования разных вирусных белков, поэтому используется для увеличения иммуногенности вирусоподобных частиц. С помощью этого ввелись в структуры ВПЧ молекулы для стимуляции иммунитета. Этот способ создания вакцин индуцирует в организмах млекопитающих полный как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы.

2. Вакцины против вируса гепатита Е (ВГЕ). Отличительной особенностью этого вируса является отсутствие оболочки и одноцепочечный РНК геном. ВГЕ содержит несколько открытых рамок считывания. Первая кодирует неструктурные белки. Вторая – капсидные белки, которые участвуют в образовании вирионов. Третья рамка считывания перекрывается первыми двумя и, скорее всего, выполняет регуляторную функцию. Исследования показали, что для производства вакцины, оптимальным вакцинным антигеном является производное второй рамки считывания, которая экспрессируется в *E. coli* и бакуловирусной экспрессионной системе.

Таким образом, можно легко создавать и воспроизводить вакцины, что является важным аспектом в современном мире.

ФИТОПРОТЕКТОРНЫЙ И ФИТОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ СМЕСИ ЛИПОПЕПТИДОВ И ГЛИОТОКСИНА НА СЕМЕНА *TRITICUM AESTIVUM* L.

Дилбарян Д.С., Доманская О.В., Васильченко А.С.

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюмень, Россия

d.d.s98@mail.ru

Предпосевная обработка семян злаковых растений является одним из важных аспектов для защиты посевов от бактериальных и грибных болезней. Накопление ряда негативных последствий из-за применения химических средств защиты, в том числе в процессе протравливания посевного материала, способствовало внедрению и использованию в сельскохозяйственной практике биологических методов защиты. Так, распространенным биологическим агентом в растениеводстве является микроорганизм *Bacillus velezensis*, способный продуцировать ряд противомикробных веществ, в том числе различные соединения из класса липопептидов. Антимикробными свойствами также известен синтезируемый *Aspergillus fumigatus* метаболит – глиотоксин, подавляющий рост широкого спектра патогенных микроорганизмов.

В данной работе оценивался антимикробный и фитостимулирующий эффект совместного действия липопептидов (комплекс сурфактинов и фенгицина) и глиотоксина, полученных из *B. velezensis* и *A. fumigatus*, соответственно, на семена *Triticum aestivum* L.

В эксперименте было выделено 9 различных вариантов обработки семян. Перед посевом семена 2 часа инкубировали в исследуемых веществах, высушивали на воздухе и проращивали во влажных камерах при 22°C. Эффект различных вариантов обработки семян оценивали по изменению морфометрических параметров семян пшеницы и по степени их зараженности грибными патогенами на 3-й день эксперимента; на 5-ый день производились измерения ростовых параметров семян. Каждый опытный вариант включал три повтора по 10 семян в каждом образце.

Было установлено, что наиболее эффективным способом обработки семян пшеницы оказался вариант липопептиды (5 мг/мл)+глиотоксин (0,3 мг/мл), при этом всхожесть семян составила 90%, а зараженных семян выявлено не было. В вариантах без совместного эффекта липопептидов и глиотоксина наблюдалось заражение семян грибными патогенами, а также более низкий процент всхожести.

ИЗУЧЕНИЕ СЕРИНОВОГО ЦИКЛА У ГАММАПРОТЕОБАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕТАНОТРОФОВ МЕТОДОМ МУТАГЕНЕЗА

Егорова С.В., Бут С.Ю.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное подразделение
ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

bohemianrhapsody12345@gmail.com

Метанотрофы – группа аэробных микроорганизмов, использующих метан или метанол в качестве источника углерода и энергии. Метанотрофы используют три пути ассимиляции углерода: рибулозомонофосфатный (РМФ), сериновый или цикл Кальвина. Метанотрофы класса *Alphaproteobacteria* (II тип) используют сериновый путь C1-ассимиляции, тогда как γ -протеобактериальные метанотрофы (Ia и Ib типы) используют РМФ-цикл как основной путь C1-ассимиляции, между тем геномный анализ показывает наличие генов, кодирующих другие пути: сериновый цикл (у всех протеобактериальных метанотрофов) и цикл Кальвина (у представителей Ib типа). В то же время функциональная роль этих альтернативных путей остается неясной. Ранее мы получили мутанты у Ia типа метанотрофа *Methylovium microbium alcaliphilum* 20Z с инактивированными генами *sga*, *sgahpr* и *mcl*. Мутанты демонстрировали выраженные фенотипы, отличающиеся от дикого типа. Цель данной работы – получение мутантов по аналогичным генам для модельного представителя метанотрофов Ib типа *Methylococcus capsulatus* Bath, их сравнение с полученными ранее мутантами метанотрофа Ia типа *Mm. alcaliphilum*.

В результате исследования у *Mc. capsulatus* с делецией гена *sga* наблюдали снижение скорости роста, по сравнению с диким типом, а также более длительную лаг-фазу, также как у мутанта *Mm. alcaliphilum* Δ *sga*. Можно предположить, что сериновый цикл важен в метаболизме как метанотрофов Ia, так и Ib типа.

Полученный мутант *Mc. capsulatus* Bath с делецией гена *mcl* имел низкую скорость роста, которая увеличивалась при добавлении в среду глицина, но не достигала скорости роста штамма дикого типа. Также, у полученных мутантов увеличивался пул ряда аминокислот при инактивации серинового цикла. Таким образом, можно предположить, что сериновый цикл вовлечен в метаболизм метанотрофов Ib типа, участвует во взаимопревращениях аминокислот, является дополнительным источником ацетил-КоА, но в отличие от метанотрофов Ia типа, у метанотрофов Ib типа сериновый путь не является единственным источником образования глицина/гликоксилата.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СБРОСА КОММУНАЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД В АКВАТОРИЮ МАЛЫХ РЕК СЕВЕРО-ЗАПАДА МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ (НА ПРИМЕРЕ РЕКИ КОЛОСЙОКИ)

Зацаринная Е.А.^{1,2}, Крылова К.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина», Рязань, Россия

²Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение
ФИЦ Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

microbiog@mail.ru

Для оценки влияния сточных вод населенных пунктов, расположенных на российской стороне акватории реки Паз, на микробное сообщество водной экосистемы реки пробы воды отбирались на трех створах на реке Колосйоки, протекающей через пгт. Никель – административный центр Печенгского района Мурманской области, а также из озера Куэтсьярви, в которое данная река впадает.

Отбор проб выполнен в летний период 2021-2022 гг. в соответствии с общими требованиями ГОСТ 31942-2012 (ISO 19458:2006) «Межгосударственный стандарт. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа». Выделение энтеробактерий из отобранных проб воды из поверхностных водных объектов осуществлялось методом мембранной фильтрации. Количественно оценивали общую численность представителей порядка *Enterobacterales*, общих колиформных бактерий (ОКБ) и термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ), *Escherichia coli*. Родовая и видовая идентификация выделенных изолятов проводилась с помощью тест-системы для ускоренной биохимической идентификации энтеробактерий «Рапид-энтеро 200 М» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург). Определение чувствительности к 21 антибактериальному препарату проводили диско-диффузным методом на поверхности среды Мюллера-Хинтона. Интерпретацию данных производили с использованием критериев EUCAST Version 11.0 (2021) и Клинических рекомендации РФ, версия 2021-01 в программном пакете аналитической системы контроля антибиотикорезистентности “WHONET”, версия 2022. Фенотипически определяли продукция бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) методом двойных дисков в соответствии с требованиями МУК 4.2.1980-04.

Численность энтеробактерий, ОКБ и *E. coli* в пробах воды р. Колосйоки увеличивается от истока к устью и находится в прямой зависимости от интенсивности антропогенной нагрузки и поступления сточных вод. Так, в верховьях реки общая численность энтеробактерий не превышала 20 КОЕ/мл, ОКБ менее 500 КОЕ/100 мл. *E. coli* не обнаружены. На территории поселка численность энтеробактерий увеличивается незначительно, однако меняется видовой состав: причем более половины из них приходится на *E. coli*. В целом, содержание ОКБ и *E. coli* на этом участке не соответствует гигиеническим требованиям СанПиН 2.1.3685-21 для водных объектов расположенных в черте населенных пунктов. В устьевом участке после впадения сточных вод очистных сооружений пгт. Никель численность всех рассматриваемых групп энтеробактерий критически возрастает. Так, по содержанию ОКБ гигиенический норматив превышен 8-15 раз.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать распространенность и устойчивость к антибиотикам энтеробактерий р. Колосйоки; показать, что в районе выпуска

очищенных сточных вод происходят существенные качественные изменения микробиоценозов водных экосистем, увеличивается численность колиформных бактерий, повышается доля резистентных культур.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ НЕКОТОРЫХ КОНСЕРВАТИВНЫХ МЕЖГЕННЫХ УЧАСТКОВ У *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS3701 ПРИ ИЗМЕНЕНИИ АЗОТНОГО СТАТУСА

Иванова Е.В.^{1,2}, Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Пушкино, Россия

ivanova05evgenia99@yandex.ru

При уменьшении количества ионов аммония в среде культивирования у *Pseudomonas putida* BS3701 снижается активность генов катаболизма нафталина. В литературе описаны 2 регулятора псевдомонад, связанных с состоянием недостатка азота: белок NtrC – активатор транскрипции и некодирующая РНК (далее – нкРНК) NrsZ – активатор трансляции. Данные о регуляторах, способных выступать в качестве репрессора экспрессии генов, в литературе отсутствуют. В связи с этим был проведен поиск нкРНК, участвующих в регуляции метаболизма азота в геноме BS3701.

В качестве целевых РНК были выбраны малые некодирующие регуляторные РНК, предсказанные с помощью программ Prokka 1.14.6 и PresRAT. В области upstream этих РНК с помощью программы SigoID был обнаружен NtrC – зависимый энхансер, а с помощью iPro54-PseKNC σ^{54} -зависимый промотор. В итоге в геноме *P. putida* BS3701 было обнаружено 22 нкРНК имеющих NtrC – зависимый энхансер и σ^{54} -зависимый промотор. После проводилось определение количества нкРНК с помощью RTqPCR.

Было отобрано 8 нкРНК, количество которых при снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ увеличивалось в разы. NrsZ имеет размер 179 нуклеотида и располагается между генами, которые кодируют регулятор транскрипции NtrC и гипотетический белок. Количество РНК увеличивалось в 2,4 раза. RsmZ имеет размер 134 нуклеотида и располагается между генами, которые кодируют сигма-фактор RpoS и белок ферредоксин FdxA. Количество РНК увеличивалось в 37 000 раз. NarK-motif имеет протяженность 76 нуклеотидов и располагается между генами, которые кодируют предполагаемый регулятор транскрипции PdtA и нитрат транспортер NasA. Количество РНК увеличивалось в 42 раза. ncRNA78 имеет размер 81 нуклеотид и располагается между генами, которые кодируют метил-акцепторный белок хемотаксиса CtpH и липополипротеин семейства YgdR. Количество РНК увеличивалось в 5,3 раза. ncRNA373 имеет размер 146 нуклеотидов и располагается между генами, которые кодируют цис-трансизомеразу SlyD и тиоредоксин/глутатион пероксидазу BtuE. Количество РНК увеличивалось в 3,7 раз. ncRNA173 имеет размер 87 нуклеотидов и располагается между генами, которые кодируют гипотетические белки. Количество РНК увеличивалось в 3,7 раз. ncRNA295 имеет размер 300

нуклеотидов и располагается между генами, которые кодируют АТФ-зависимая РНК-хеликаза RhE и транспозазу ISPsy8. Количество РНК увеличивалось в 3,5 раз. ncRNA110 имеет размер 59 нуклеотидов и располагается между генами, которые кодируют гипотетический белок и альдо/кето редуктазу. Количество РНК увеличивалось в 1,7 раз.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-01138, <https://rscf.ru/project/22-24-01138/>.

НОВЫЕ ПОЧВЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ – ЭФФЕКТИВНЫЕ ДЕСТРУКТОРЫ ФЕНОЛОВ И НЕФТИ

Иминова Л.Р.^{1,2}, Поливцева В.Н.²

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБФМ РАН), Пушкино, Россия

uzdleila90@gmail.com

Наиболее распространенными и опасными химическими соединениями, загрязняющими окружающую среду, являются фенол, его производные и нефть. Ежегодно происходит более 60 крупных аварий и около 20 тыс. случаев, сопровождающихся значительными разливами данных соединений. Поэтому выделение и характеристика новых штаммов-деструкторов токсичных соединений являются перспективным направлением исследований.

Методом накопительного культивирования из образцов загрязненных и незагрязненных земель были выделены изоляты, способные к деструкции фенола, хлорфенолов и нефтепродуктов. Культуры прежде всего были проверены на способность использовать фенол, хлорфенолы и нефтепродукты в качестве единственного ростового субстрата в минеральной среде, при их концентрации в среде от 0,1 г/л до 3,0 г/л и 1–2% соответственно. Для отобранных изолятов было определено их филогенетическое положение методом секвенирования гена 16S рРНК. Для наиболее активных изолятов была определена способность наращивать биомассу при повышенной солености среды в широком диапазоне температур (от 25°C до 50°C).

В ходе исследования, было определено, что штамм *Rhodococcus* sp. 7B способен к утилизации фенола в концентрации 2 г/л и нефтепродуктов, при 10% солености среды при температурах от 28°C до 45°C. Штамм *Ex. alkaliphilum* активно деградирует углеводороды при 28°C и солености 11%. Процент убыли нефтепродуктов в образцах, обработанных исследуемыми штаммами, составил от 34,5 до 51% за 15 суток соответственно. Штамм *Rhodococcus* sp. 7Ba растет на феноле в концентрации до 1 г/л, а также на хлорфенолах: 4-хлор, 2,4-дихлор и 2,4,6-трихлорфенолах в концентрации до 0,1 г/л, штаммы *Acinetobacter* sp. Fch 5/2, *Fictibacillus* sp. VMI-2 и *Mesobacillus* sp. VMI-11 способны к утилизации фенола в концентрации до 2 г/л, а также 4-хлорфенола (4ХФ) до 0,1 г/л.

Исследование позволило выделить бактерии-деструкторы токсичных соединений, показало перспективу их использования для создания биопрепаратов для очистки объектов

окружающей среды от токсичных загрязнителей в широком диапазоне температур при высокой солености очищаемой среды.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00590, <https://rscf.ru/project/23-24-00590/>.

УСЛОВИЯ МАКСИМАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НОВОГО РП-ПОДОБНОГО БЕЛКА POTN И ЕГО БЕЛКА-ПАРТНЕРА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ GLNR В КЛЕТКАХ *LENTILACTOBACILLUS HILGARDII*

Исхакова З.И., Журавлева Д.Э., Каюмов А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

zalinunya@mail.ru

РП белки представляют собой «молекулярные процессоры», встречающиеся в клетках бактерий, архей и в пластидах растений. Конкурентно связывая ключевые метаболиты (нуклеотиды, 2-оксоглутарат, глутамин), РП белки воспринимают метаболическое состояние клетки. В связанном с метаболитом состоянии РП белки изменяют свою конформацию, благодаря чему они обратимо взаимодействуют с широким спектром белков-мишеней, обеспечивая оптимальный уровень азотного и углеродного обмена в ответ на изменения доступности питательных веществ. При секвенировании генома *Lentilactobacillus hilgardii* было показано, что данная бактерия в своем геноме имеет ген РП-подобного белка PotN. В качестве белка-мишени для PotN был выявлен фактор транскрипции GlnR. Для РП белков характерна работа при недостатке питательных веществ в среде. Поэтому были смоделированы условия недостатка некоторых питательных веществ для определения условий повышенной экспрессии генов *potN* и *glnR*. Так штамм *L. Hilgardii* культивировали на селективной среде в течение длительного времени для постепенного истощения среды. Данные условия не вызвали значительного увеличения экспрессии генов. После чего был смоделирован условия резкой смены среды, для этого бактерии переносили из богатой питательной среды в условия недостатка питательных веществ либо с добавлением различных источников азота, либо с добавлением в различных соотношениях источников азотного и энергетического питания. Гены РП белков транскрибируются в ответ на недостаток азота в питательной среде, однако нельзя сделать однозначный вывод о том, что ген *potN* также транскрибируется в ответ только на низкое содержание азота в среде. Экспрессия гена *potN* повышалась в условиях повышенного содержания глутамина совместно с пониженным содержанием глюкозы. В тех же самых условиях было обнаружено повышение экспрессии гена *glnR*. Гены *potN*, *glnR* входят в состав оперонов *potABCD* и *glnRA*, соответственно, экспрессия которых находится под контролем фактора транскрипции GlnR. Таким образом если в одних и тех же условиях повышается экспрессия гена как самого фактора транскрипции, так и генов подконтрольным ему, это означает, что данный фактор транскрипции, по всей видимости, является активатором экспрессии генов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В МЕТАБОЛИЗМЕ ЦИСТЕИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ГЛУТАТИОНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА НА *ESCHERICHIA COLI*

Калашникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

tatyana-kalashnikova22@yandex.ru

Фторхинолон ципрофлоксацин – антибиотик бактерицидного действия. Предполагается, что в механизме быстрой гибели, опосредованной хинолонами участвуют активные формы кислорода (АФК). Ранее мы показали, что воздействие ципрофлоксацина на бактерии *E. coli* сопровождается ускорением синтеза глутатиона (GSH), который, среди прочего, выступает в роли буфера внутриклеточного цистеина. Избыток цистеина потенциально опасен для клеток, поэтому включение его в глутатион может играть существенную роль в гомеостазе цистеина и предотвращении образования АФК. Целью данной работы было определить, как мутации генов, связанных с метаболизмом цистеина, влияют на изменения GSH внутри и снаружи клеток при действии ципрофлоксацина.

Объектом исследований служили штаммы *E. coli* из коллекции Keio: родительский штамм BW25113 (wt) и мутанты JW1718 ($\Delta tcyP$), JW1267 ($\Delta cysB$), JW2407 ($\Delta cysK$), JW2414 ($\Delta cysM$), JW2505 ($\Delta sseA$, $mstA$) и JW5518 ($\Delta cyuA$), с нарушенным транспортом или метаболизмом цистеина. Культуру бактерий выращивали на среде LB. Ночную культуру разбавляли до начальной OD_{600} около 0.05 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37°C, 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, после чего в среду вносили 10 мкг/мл ципрофлоксацина (ЦФ) и продолжали инкубацию в течение двух часов. Периодически отбирали пробы для определения OD_{600} и глутатиона внутри и снаружи клеток. Глутатион измеряли спектрофотометрическим циклическим методом Tietze, используя реагент дитионитробензоат (DTNB) и глутатионредуктазу.

Удельная скорость роста родительского штамма равнялась $1.24 \pm 0.015 \text{ час}^{-1}$. Отличие в скорости наблюдалось у штамма *cysB* и составляло $0.82 \pm 0.015 \text{ час}^{-1}$. Воздействие ципрофлоксацина сопровождалось ингибированием роста бактерий во всех штаммах.

Среда LB без бактерий содержала 11 μM GSH. Уровень внутриклеточного GSH (GSH_{in}) у родительского штамма в контроле составлял 9.5 $\mu\text{M}/OD_{600}$. Концентрация GSH_{in} у мутантов была ниже, наибольшее отличие показал штамм *cysB*, с начальным уровнем глутатиона 0.85 $\mu\text{M}/OD_{600}$, который снижался в процессе культивирования до 0.48 $\mu\text{M}/OD_{600}$. Добавление ципрофлоксацина вызывало повышение концентрации глутатиона внутри клеток во всех штаммах, при этом максимум достигался через 1 час после внесения антибиотика. В клетках родительского штамма ципрофлоксацин увеличивал уровень GSH_{in} в 1.3 раза, подобное повышение наблюдалось во всех штаммах, за исключением *cysB*. В клетках мутанта *cysB* концентрация внутриклеточного глутатиона увеличивалась в 3.2 раза (с 0.85 $\mu\text{M}/OD_{600}$ до 2.7 $\mu\text{M}/OD_{600}$).

Ранее мы показали, что на второй фазе ответа на ципрофлоксацин, наблюдается выход GSH из клеток в среду. В настоящей работе максимальное накопление глутатиона в среде (GSH_{out}) наблюдалось через 2 часа после внесения ЦФ. Уровень внеклеточного глутатиона в родительском штамме при действии антибиотика увеличивался в 6.2 раза. Схожее повышение наблюдалось у мутантов *cysM* (в 5.9 раз), *sseA**mstA* (в 7.1 раз) и *cysA* (в 6.3 раз). В штаммах *tcyP* и *cysB* концентрация GSH_{out} под действием ципрофлоксацина увеличивалась в 3.3 и 1.6

раз соответственно. Наибольший выход глутатиона в среду наблюдался у мутанта *cysK*, уровень изменялся с 1.45 до 13.3 $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ (в 9.2 раза).

Таким образом, в ответ на действие ципрофлоксацина, повышение уровня внутриклеточного GSH на первой фазе ответа и последующее накопления глутатиона в среде на второй фазе может быть связано с возникновением избытка внутриклеточного цистеина и его метаболизмом.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ И ЦЕОЛИТА

Карасева О.С., Гаврилова Е.А., Яхиа М. Наит, Каюмов А.Р., Яруллина Д.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

olkakarp66@gmail.com

Применение пробиотических добавок в сельском хозяйстве способствует повышению резистентности животных к неблагоприятным факторам внешней среды, улучшает иммунный статус организма, стимулирует рост и развитие молодняка, а также улучшает качество получаемой продукции. Целью данной работы является разработка пробиотической кормовой добавки на основе штамма *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L и цеолита.

Бактерии *L. plantarum* FCa3L выделены нами из квашеной капусты в 2014 году. Таксономическая идентификация выполнена с помощью MALDI Biotyper (Bruker, Германия) и методом секвенирования гена 16S рНК. Обнаружена антагонистическая активность в отношении *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. Гидрофильность, основные и электрон-донорные свойства поверхности клеток *L. plantarum*FCa3L указывают на низкую адгезивность. При этом FCa3L превосходит референсный штамм *L. plantarum*8P-A3, выделенный из пробиотического препарата «Лактобактерин сухой» (ФГУП НПО «Биомед»), по адгезии на буккальных эпителиоцитах и автоагрегации клеток. Установлено, что бактерии FCa3L имеют типичный для лактобацилл профиль антибиотикорезистентности с природной устойчивостью к ванкомицину, ципрофлоксацину и аминогликозидам. С помощью совместного культивирования на МРС-агаре показали, что FCa3L биосовместимы с другими пробиотическими лактобациллами и, следовательно, могут быть использованы в составе мультиштаммовых препаратов. Ключевым результатом исследования является разработка способа иммобилизации *L. plantarum* FCa3L на цеолите Татарско-Шатрашанского месторождения (Республика Татарстан) в питательной среде на основе отхода пищевой промышленности – молочной сыворотки. Полученные нами опытные серии иммобилизованных препаратов-синбиотиков с различным соотношением цеолита и FCa3L протестированы *in vitro* на стабильность содержания жизнеспособных бактерий. Структура матрикса препаратов визуализирована с помощью оптической микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ-22-16-00040) в рамках Программы стратегического академического лидерства (ПРИОРИТЕТ-2030).

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛЕКТИНОВ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ *ASPERGILLUS NIGER*

Клементьев С.В.¹, Миндубаев А.З.¹, Кобелев А.В.¹, Минзанова С.Т.²

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет
(КНИТУ КХТИ), Казань, Россия

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН,
Казань, Россия

a.mindubaev@knc.ru; mindubaev-az@yandex.ru

Нами впервые в мире наблюдался рост микроорганизмов в культуральных средах, содержащих белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В процессе исследований были обнаружены новые штаммы гриба, идентифицированного как черный аспергилл. Источником этих уникальных организмов стала емкость с кусковым белым фосфором, погруженным в толщу воды. Для культивирования *Aspergillus niger* AM1 и AM2 использовалась среда Сабуро.

Исследование лектиновой активности на хлорелле с клеточной стенкой из целлюлозы показало сильную активность, как внеклеточную, так и внутриклеточную. Из-за наличия клеточной стенки водоросль не самый удачный объект. Тем не менее, показана четкая разница лектиновой активности двух штаммов. У AM2 сильная активность, как внеклеточная, так и внутриклеточная. У AM1 она слабая, в серии разведений проявляется только в первой лунке.

Исследование на эритроцитах кролика показало, что лектины наших грибов обладают выраженной гемолитической активностью. Это свидетельствует о токсичности для млекопитающих, в том числе людей. Наибольшей активностью обладает культуральная среда, очищенная от взвешенных частиц фугованием. Лектины наших грибов демонстрируют гемолиз до 6-9 рядов лунок, а разрушение клеток хлореллы, покрытых клеточными стенками, до 2 ряда. В каждом последующем ряду лунок концентрация среды и, соответственно, лектинов, падает вдвое.

У AM2 активность лектинов выше, чем у AM1. В среде Сабуро активность лектинов через 5 суток была в 8-9 раз выше, чем в среде Чапека через 30-35 суток. Это связано не только с приростом биомассы, но и, по-видимому, с усилением выработки лектинов. Высокая гемолитическая активность свидетельствует о токсичности для человека. Это может стать помехой в использовании для биодеградаци. Зато, открывает перспективы создания на основе штаммов лекарственных препаратов (антибактериальных, противогрибковых), сельскохозяйственных препаратов для борьбы с вредителями. Планируется исследование активности против бактериальных и грибковых культур.

Показано, что лектины из исследуемых культур выдерживают однократную заморозку на 10 дней. После второй заморозки их активность резко снижается. Вероятно, белковые молекулы лектинов повреждаются кристаллами льда, но при слабых повреждениях их нативная структура сохраняется.

ВЛИЯНИЕ ЦИСПЛАТИНА И МЕТФОРМИНА НА МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА МЫШЕЙ

Кокина А.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

anastasia.kokina@mail.ru

Микробиом кишечника принимает непосредственное участие в метаболических процессах организма. Нарушение баланса его бактериального состава оказывает влияние на здоровье организма в целом.

Цель нашей работы заключалась в изучении влияния цисплатина и метформина на бактериальный состав микробиома кишечника мышей.

Объектом исследования служили самцы и самки лабораторных мышей линии C57BL/6. Все мыши были размещены в пластиковые клетки при стандартных условиях с доступом к пище и воде. Мыши были разделены на три группы: контрольная, опытная (I) (группа мышей, получавших внутрибрюшинные инъекции цисплатина) и опытная (II) (группа мышей, получавших внутрибрюшинные инъекции цисплатина и с питьем раствор метформина). Эксперимент проводили в течение 4 недель, с лабораторных мышей было проведено 3 сбора кала, содержащего микробиом кишечника животных, в разные периоды времени. Нами в ходе работы была проведена количественная оценка различных групп бактерий микробиома кишечника мышей при употреблении раствора метформина с водой и инъекций цисплатина.

При длительном приеме метформина и инъекций цисплатина у мышей наблюдались следующие изменения бактериального состава микробиома кишечника: у мышей из опытной группы (I) количество бактерий типа *Tenericutes* у самцов на 29,11 % ($p < 0,05$) и у самок на 49,43 % ($p < 0,05$) больше, чем у контрольной группы. Различия в опытной группе (II): бактерий типа *Actinobacteria* у самцов на 37,30 % ($p < 0,05$) и у самок на 74,02 % ($p < 0,05$) больше, типа *Verrucomicrobia* у самок на 27,48 % ($p < 0,05$) больше, чем в микробиоме контроля.

Повышение содержания бактерий типа *Tenericutes* может свидетельствовать о воспалительном поражении урогенитального тракта. Бактерии типа *Actinobacteria* способны обеспечивать защиту от патогенных микроорганизмов. Повышение содержания бактерий типа *Verrucomicrobia* является показателем улучшения метаболизма глюкозы.

Подводя итог, следует отметить, что цисплатин вызывает нарушение равновесия нормального состава микробиома кишечника, способствуя росту условно-патогенных бактерий. Комплексная терапия метформином и цисплатином поддерживает состав микробиома кишечника мышей в пределах нормы и улучшает метаболизм глюкозы.

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНОГО ШТАММА *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* Par7, ДЕФЕКТНОГО ПО ГЕНУ *alkB1*

Копылова О.А.¹, Кочаровская Ю.Н.², Позднякова-Филатова И.Ю.², Делеган Я.А.²

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Скрябина, Пушино, Россия

oa.kopylova01@gmail.com

Интегрально-связанные с мембраной алканмонооксигеназы являются наиболее часто встречающимися гидроксилазами алканов у бактерий и кодируются генами семейства *alkB*. При этом для эритрополисной группы рода *Rhodococcus* характерно наличие от 2 до 5 копий *alkB* в геноме.

Штамм *Rhodococcus erythropolis* Par7 является деструктором C₈-C₂₂ n-алканов. По результатам секвенирования генома установлено, что штамм несет на хромосоме 4 гомологичных гена *alkB*, два из которых (*alkB1* и *alkB2*) являются частью кластеров генов с генами рубредоксина и рубредоксинредуктазы, а еще два (*alkB3* и *alkB4*) представлены одиночными генами. Целью настоящей работы является получение штамма *R. erythropolis* Par7, дефектного по гену *alkB1*, методом направленного мутагенеза для изучения роли гена *alkB1* в деградации n-алканов.

Для осуществления гомологичной рекомбинации была сконструирована плаزمиды, содержащая фрагменты upstream и downstream относительно гена *alkB1*. Фланкирующие ген области, размером 500-600 п.н. каждая, были клонированы в составе плазмидного вектора pEX18Gm с помощью Gibson Assembly. Указанный вектор не способен к репликации в клетках родококков, а также содержат ген левансахаразы *sacB*, превращающий сахарозу в токсичный для клеток леван. В результате была получена конструкция pEX18GmΔ*alkB1* размером 6881 п.н., которой затем трансформировали клетки *E. coli* DH5α. В выделенной затем плазмидной ДНК наличие и корректность клонируемого фрагмента была подтверждена амплификацией и секвенированием по Сэнгеру. Конъюгативный штамм *E. coli* S17-1 трансформировали конструкцией pEX18GmΔ*alkB1*. Конъюгацию бактерий *R. erythropolis* Par7 и *E. coli* S17-1 [pEX18GmΔ*alkB1*] проводили на фильтрах, трансконъюгантов высевали на плотную питательную среду Лурия-Бертани с гентамицином и налидиксовой кислотой. Это позволило отобрать колонии *R. erythropolis* Par7, являющихся меродиплоидами.

Следующим этапом работы станет получение мутантов *R. erythropolis* Par7, отобранных по росту на селективной среде с сахарозой, в которых благодаря гомологичной рекомбинации мутантная аллель в виде двух сцепленных фланкирующих областей заменит нативную.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, УЧАСТВУЮЩИХ В
ДЕГРАДАЦИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, В ХРАНИЛИЩ-КАРТАХ
НА ПОБЕРЕЖЬЕ ОЗ. БАЙКАЛ

Кочаровская Ю.Н.¹, Севостьянов С.М.², Демин Д.В.^{2,3}, Делеган Я.А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушино, Россия

³Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Фитопатологии, Одинцово, Россия

kocharovskayaj@mail.ru

Шлам целлюлозно-бумажного комбината является одним из наиболее важных источников для изучения новых кандидатов микробиоты для эффективного разложения лигноцеллюлозы. Хранилищ-карты, расположенные на побережье Байкала, являются местом захоронения огромного объема отходов Байкальского целлюлозно-бумажного комбината. В настоящее время ведутся работы по утилизации отходов с применением технологии компостирования, которая обеспечивает эффективное разложение лигноцеллюлозы за счет деятельности микроорганизмов. Основываясь на высокопроизводительном секвенировании, мы можем всесторонне определить микробное разнообразие, участвующее в разложении лигноцеллюлозы, и оценить таксономический и функциональный профиль с высоким разрешением.

С разных участков шламонакопителя №4 были отобраны две пробы 1.1 и 4, а методом твердофазной ферментации получены образцы 5.1 и 8.1. ДНК выделяли с помощью набора FastDNA SPIN Kit for Soil по стандартному протоколу. Секвенирование выполнено на оборудовании DNBSEQ400. Полученные прочтения отфильтрованы и собраны. Контиги аннотированы с помощью веб-сервиса MG-RAST с использованием баз данных RefSeq и KEGG. Статистический анализ проведен с использованием веб-сервиса MicrobiomeAnalyst. Аннотировано 3633174 прочтений, при этом максимальное количество аннотированных прочтений на образец составило 1259872, а минимальное 536431. Из полученных данных метагеномной ДНК шлам-лигнина было идентифицировано 3630208 генов. Отмечено доминирование бактерий (880049ORF), что составляет 96,97% от общего числа идентифицированных ORF, в то время как остальные принадлежали археям и эукариотам. В образцах наблюдается наличие 4 архейных (55 родов), 28 бактериальных (577 родов) и 25 грибных (138 родов) типа. *Proteobacteria* являются наиболее доминирующей и космополитичной группой. Отмечено, что к коровому микробиому с установленным порогом численности в 90% относятся *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*. Оценка функционального потенциала показала, что к углеводному обмену принадлежит 139692 ORF. Среди ORF, связанных с метаболизмом углеводов, на основе базы данных KEGG были аннотированы 5138 ORF, кодирующих ферменты/белки, участвующие в деградации лигноцеллюлозы. В пробе 8.1 количество этих прочтений в 2 раза меньше, чем в 1.1 и 4, что указывает на больший метаболический ресурс микробиомов в пробах шлам-лигнина по сравнению с почво-грунтом. Значительная часть прочтений, относящихся к ферментам деградации лигноцеллюлозы, была отнесена к 3 таксонам: *Shewanella*, *Achromobacter* и *Delftia*, которые принадлежат трем группам ферментов: hemicellulase, cellulase и pretreatment соответственно, но доля этих бактерий не превышает 0,5% от найденного микробного разнообразия.

Несмотря на то, что в мировой практике наиболее известными деструкторами лигноцеллюлозы считаются грибы, наша работа демонстрирует, что бактерии являются многообещающими кандидатами в утилизации отходов шлам-лигнина, так как их метаболические пути наиболее многочисленны и универсальны, а организмы их несущие разнообразны.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИОФАГА ϕ VP-AMP1

Крупская М.Н.^{1,2}, Богдан В.И.², Летарова М.А.², Иванов П.А.², Летаров А.В.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра вирусологии,
Москва, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

krupskayamary@gmail.com

Бактериофаги – один из главных факторов регуляции численности и разнообразия бактериальных популяций. Часто такие вирусы способны регулировать способ взаимодействия с бактериями-хозяевами в ответ на изменение тех или иных внешних условий. В частности, фаги *Burkholderia* ϕ Vp_AMP1, предположительно, являются естественным механизмом контроля популяций возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei*. Важной чертой этих фагов является наличие молекулярного сенсора, который блокирует литический цикл при температуре среды меньше 25°C. Заболеваемость мелиоидозом имеет резко выраженную сезонную динамику в ряде районов эндемичных регионов. Высказывались предположения, что популяционные взаимодействия фаг-хозяин могут быть ответственными за эти явления. В связи с этим, исследование бактериофагов *B. pseudomallei* может быть полезно для эпидемиологического прогнозирования мелиоидоза.

Большинство бактериофагов, выделяемых из почвы, генетически родственны фагу Vp_AMP1, относящемуся к *Caudovirales*. Это согласуется с предположением о роли этих вирусов как естественного агента биоконтроля популяции хозяев. В настоящее время не вполне ясно, являются ли фаги, родственные AMP1, вирулентными или умеренными. Тем не менее, четкая зависимость роста (способности образовывать бляшки) данных фагов от температуры была надежно установлена.

В работе использовались две линии фага ϕ Vp_AMP1: SPL1 (холодотолерантный мутант) и AMP1 (дикий тип). Ранее у SPL1 была выявлена делеция, захватывающая четыре открытых рамки считывания. Мы предположили, что толерантность данного штамма к низким температурам связан с тем, что в делеции присутствует ген, кодирующий репрессор, который ингибирует переход к литическому циклу.

В качестве хозяина была взята непатогенная бактерия *B. thailandensis*, родственная *B. pseudomallei* и имеющая сходные закономерности развития фагов ϕ Vp_AMP1. Для проведения эксперимента были получены экспрессионные конструкции с предполагаемыми репрессорами (предполагаемый ген-репрессор; слитая рамка считывания, возникающая в результате делеции в SPL1; ген, находящийся вне делеции, но, предположительно, взаимодействующий с потенциальным геном репрессора). Сравнивались эффективности посевов фагов в зависимости от температуры и наличия вышеописанных конструкций.

Было обнаружено, что присутствие предполагаемого «репрессора» увеличивает эффективность посева обоих фагов, что говорит в пользу антирепрессорного действия белка. Для полученной при делеции слитой рамки считывания косвенно продемонстрирована токсичность соответствующего белкового продукта. Для гена, находящегося вне делеции была показана репрессорная функция.

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНОВ-ФАКТОРОВ ИНВАЗИИ У БАКТЕРИЙ РОДОВ *CHRYSEOBACTERIUM*, *ELIZABETHKINGIA*, *EMPEDOBACTER*

Кузнецова В.А.¹, Зубова К.В.¹, Голубев Д.М.¹, Каневский М.В.¹,
Кондратенко О.В.², Глинская Е.В.¹

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

²Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Самара, Россия

dimagolubev2018@yandex.ru

Наследственность и широкая распространенность муковисцидоза привлекает внимание ученых-исследователей во всем мире. Микроорганизмы различных систематических групп являются причиной осложнения протекания болезни. Целью исследования являлось определение наличия генов, кодирующих продукцию ряда ферментов, у штаммов бактерий родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter*.

В работе использовали штаммы бактерий, изолированные от пациентов с муковисцидозом: *Chryseobacterium arthrosphaerae*, *C. gleum*, *C. indologenes*, *Elizabethkingia anopheles*, *E. meningoseptica*, *Empedobacter falsenii*. Идентификацию микроорганизмов проводили методом MALDI-TOF. Присутствие у бактерий генов коллагеназы, эластазы, нейраминидазы и гиалуронидазы как потенциальных факторов инвазии определяли с помощью набора 5XScreenMix (ЗАО «Евроген»). Подбор праймеров осуществляли при помощи программы Primer-BLAST. Синтез праймеров осуществляли в ЗАО «Евроген». Режим амплификации подбирали согласно инструкции 5XScreenMix. Обнаружение амплифицированной ДНК проводили с использованием гель-электрофореза.

Результаты исследований показали, что 60 % штаммов *C. arthrosphaerae* содержат ген эластазы, 40 % – ген нейраминидазы. У 100 % штаммов *C. gleum* присутствует ген эластазы. Все исследуемые штаммы *C. indologenes* содержат гены эластазы, нейраминидазы и гиалуронидазы. 67 % штаммов *E. anopheles* имеют гены эластазы и гиалуронидазы. 67 % штаммов *E. meningoseptica* содержат ген эластазы. 100 % штаммов *E. falsenii* несут в себе ген гиалуронидазы. Все изученные штаммы содержат ген коллагеназы.

Таким образом, в ходе исследований было установлено, что бактерии родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter* являются носителями генов, несущих информацию о ферментах, обуславливающих инвазивные свойства исследованных микроорганизмов.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *MICROBACTERIUM AURUM* В ПРИСУТСТВИИ *BREVUNDIMONAS BULLATA*

Кузьмицкая А.А., Тихонова П.С., Калёнов С.В.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

kuzmichwolf@gmail.com

В ходе скрининга сообществ микроорганизмов пойменных биотопов, загрязнённых синтетическими полимерными отходами различного происхождения, был выделен бактериальный консорциум, представленный грамположительными и грамотрицательными палочковидными клетками. Результаты секвенирования фрагментов гена 16SpPHK показали, что данный консорциум включает в себя два штамма генетически наиболее близких к видам *Microbacterium aurum* (грамположительные, неподвижные, аэробные палочковидные клетки неправильной формы, образующие колонии жёлтого цвета) и *Brevundimonas bullata* (граммотрицательные, подвижные, аэробные палочковидные клетки, образующие слизистые полупрозрачные колонии белого цвета).

Попытки выделения монокультуры *Microbacterium aurum* показывают, что *B. bullata* и *M. aurum* связаны между собой определёнными метаболическими взаимодействиями, так как их крайне затруднительно изолировать друг от друга классическими методами. Диапазон значений pH, при которых возможен рост исследуемых микроорганизмов, составляет 5-11 и практически одинаковый для обоих видов. Выделение чистой культуры *M. aurum* также осложнено подвижностью клеток *B. bullata* и их большей скоростью роста, по сравнению с клетками *M. aurum*. Иными словами, *B. bullata* быстрее адаптируется к окружающим условиям и быстрее ассимилирует доступные компоненты питательной среды. Так, культивирование *M. aurum* и *B. bullata* в жидкой питательной среде LB (pH 7, 28°C) вызвало сдвиг популяционного равновесия в сторону увеличения численности *B. bullata*, в то время как культура *M. aurum* в этих условиях подавлялась.

Бактерии *B. Bullata* не способны использовать крахмал в качестве питательного субстрата. Поэтому дальнейшее культивирование *M. aurum* и *B. bullata* проводилось в жидкой питательной среде, содержащей крахмал и дрожжевой экстракт, в качестве источников углерода (pH7, 28°C), что позволило индуцировать рост *M. aurum* и увеличить долю этих микроорганизмов в культуральной жидкости. Стимулировать дальнейшее увеличение численности *M. aurum* можно последовательными пересевами, постепенно снижая концентрацию дрожжевого экстракта в среде и используя в качестве посевного материала не культуральную жидкость (клетки *B. bullata* подвижны), а биомассу каймы, образуемой бактериями на стенках колб в процессе культивирования.

Основными факторами, влияющими на соотношение двух популяций бактерий в исследуемом сообществе, являются состав питательной среды и качество отобранного посевного материала. Однако дальнейшее изменение состава питательной среды и её оптимизация могут не привести к полной гибели клеток *B. bullata*. В связи с этим, необходимо осуществить подбор антибиотиков узконаправленного спектра действия и методов их применения с целью создания полностью селективной питательной среды для выделения чистой культуры *Microbacterium aurum* из данного консорциума.

ФУНКЦИОНАЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ *COMAMONAS SP. SA47*

Кулеш П.А.¹, Корсакова Е.С.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ
УрО РАН, Пермь, Россия

polinapolliolog@gmail.com

Современный уровень загрязнения пластиком резко увеличивается из-за накопления пластиковых отходов, в том числе полиэтилентерефталата, главным компонентом производства которого является терефталевая кислота. Традиционные методы химического и физического разложения пластика оказывают неблагоприятное воздействие на окружающую среду, следовательно, использование микроорганизмов в последнее время приобрело большое значение.

Цель работы – изучить функционально-генетические особенности штамма-деструктора терефталевой кислоты (ТФК) *Comamonas sp. SA47*, выделенного из активного ила биологических очистных сооружений химического предприятия (г. Пермь).

Показана способность штамма SA47 использовать в качестве ростового субстрата ТФК в диапазоне концентраций от 1 до 20 г/л. Установлено, что наиболее оптимальное для роста штамма содержание ТФК в среде – 10 г/л, при которой выявлены максимальные значения ОП₆₀₀ (1,3 о.е.) и удельной скорости роста ($\mu=0,043\pm 0,004 \text{ ч}^{-1}$), зарегистрированные через 71 час. Утилизация ТФК за данный промежуток времени составляла 61,2%.

В клетках штамма SA47 обнаружены 2 плазмиды (около 20 и 100 т.п.н.), а также детектирован ключевой ген деструкции ТФК (*tphA1*), кодирующий α -субъединицу терефталат-1,2-диоксигеназы. Анализ транслированной аминокислотной последовательности секвенированного фрагмента *tphA1*-гена показал наибольшее сходство (на уровне 96.3%) с гомологичными генами бактерий-деструкторов ТФК рода *Comamonas*.

Таким образом, штамм *Comamonas sp. SA47* способен к эффективной деградации терефталевой кислоты и представляет интерес для разработки перспективных технологий очистки стоковых отходов химических предприятий и биоремедиации загрязненных почв.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ ГЛИКОЛИПИДНОГО БИОСУРФАКТАНТА БАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCLUS* ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Леонова Т.И., Акатова Е.В.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

tatyanka-leonova-99@mail.ru

Поверхностно-активные соединения (ПАВ), продуцируемые микроорганизмами (биоПАВ, биосурфактанты), привлекают внимание учёных в качестве альтернативы синтетическим ПАВ (СПАВ) за счёт своих преимуществ биоПАВ перед СПАВ. Причиной ограниченного промышленного производства является низкая концентрация биоПАВ в культуральной среде. Оптимизация условий культивирования микроорганизмов может повысить выход биоПАВ в несколько раз. В связи с этим, целью данной работы было определить оптимальное время культивирования штамма *Rhodococcus erythropolis* X5 с максимальным выходом продукции гликолипидов.

Бактерии выращивали на минеральной среде Эванса с 2% подсолнечного масла в течение 30 суток при 28 °С. Наличие гликолипидных биоПАВ подтверждали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и фенольно-серным методом спектрофотометрии.

До 24 суток продукция биоПАВ в среде увеличивалась (максимум составил 1,12 г/л), а затем снижалась. Минимум поверхностного натяжения соответствовал 35 мН/м. ТСХ подтвердила наличие углеводной части во всех пробах. При этом на 3 сутки обнаружено одно пятно с R_f (величиной удерживания) 0,56. На 6 сутки инкубации 4 пятна имели наиболее интенсивную окраску с $R_{fот}$ 0,3 до 0,5. Далее наблюдали уменьшение количества пятен и присутствие примесей в пробах. В пробах на 19-30 сутки роста проявлялось по одному пятну с близким значением $R_{f0,13-0,16}$. Это говорит о более высокой полярности компонентов, т.е. в пробах имеются соединения структурно отличимые от гликолипидов, обнаруженных ранее. Поскольку, с фенольным реагентом взаимодействуют все сахара, содержащиеся в среде, это могло завязать данные по продукции биоПАВ. Поэтому для сравнения желательно использовать два метода.

Таким образом, для получения наибольшего выхода продукции биоПАВ штамма *Rhodococcus erythropolis* X5 предпочтительнее проводить культивирование не более 2-х недель, однако оптимальным является 6-10 дней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ КОНСТРУИРОВАНИЯ БЕСПЛАЗМИДНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ КОРИНЕБАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ БАКТЕРИОФАГОВ

Лобанова Ю.С.¹, Горшкова Н.В.¹, Крылов А.А.¹, Стойнова Н.В.¹, Машко С.В.^{1,2}

¹Акционерное Общество «Научно-Исследовательский Институт Аджиномото-Генетика»,
Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

yulia_lobanova@agri.ru

Corynebacterium glutamicum, грамположительная почвенная бактерия, впервые выделенная в ходе поисков природного продуцента L-глутамата, в настоящее время стала важным микроорганизмом крупномасштабной промышленной биотехнологии. В связи с чем разработка новых удобных и эффективных методов для редактирования генома *C. glutamicum* не утратила своей актуальности и по сей день.

Представленный новый метод, основанный на реализации стратегии Dual-In/Out, изначально разработанной для *Escherichia coli*, с последующим комбинированием полученных модификаций посредством электротрансформации геномной ДНК, позволяет осуществить введение необходимого количества копий целевых генов, в том числе протяженных кассет, в геном *C. glutamicum* в заранее выбранные точки хромосомы.

Стратегия Dual-In/Out, разработанная для *C. glutamicum*, состоит из нескольких последовательных этапов и приводит к созданию безмаркерного бесплазмидного рекомбинантного штамма. На первом этапе осуществляется интеграция маркера, фланкированного attL/attR-сайтами коринефага φ16, в желаемую точку на хромосоме с помощью RecET-опосредованной системы рекомбинации Рас профага *E. coli* (первый «IN» в названии стратегии Dual-In/Out). На втором этапе проводится φ16-Int/Xis-зависимое вырезание интегрированного маркера, в результате чего формируется искусственный φ16-attB сайт (первый «OUT»). На третьем этапе реализуется φ16-Intзависимая сайт-специфическая интеграция нерепликативной плазмиды, несущей желаемую кассету, в ранее сконструированный искусственный φ16-attB сайт (второй «IN»). На заключительном четвертом этапе производится вырезание векторной части интегративной плазмиды, окруженной рекомбинантными lox-сайтами, посредством сайт-специфической системы Cre/loxP фага P1 *E. coli*.

Впервые посредством электротрансформации геномной ДНК было осуществлено объединение в одном реципиенте штамме *C. glutamicum* единичных маркированных инсерций, полученных с помощью Dual-In/Out стратегии.

Было установлено, что точки на хромосоме, преселектированные с помощью Mu-зависимой системы транспозиции, способны к высокоэффективному переносу в отличие от произвольно выбранных локусов, что, по всей вероятности, связано с пространственной организацией нуклеоида.

Кроме того, было показано, что экспрессия генов, кодирующих RecET, усиливая гомологичную рекомбинацию в штамме-реципиенте, делает возможным перенос модификаций, сконструированных в любых локусах хромосомы.

ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ИЗ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ АРКТИЧЕСКИХ ГРУНТОВ И ОЦЕНКА ИХ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

Логвинова Е.Ю.¹, Семенова Е.М.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, Россия

logvinovaekaterina@gmail.com

Арктика на сегодняшний день – стратегически важный регион, место разведки и добычи разнообразных полезных ископаемых, развития науки и туризма. Антропогенная активность неизбежно приводит к росту экологических рисков и возможных разливов нефтепродуктов. Одним из решений по очистке от углеводородных загрязнений является биоремедиация, поэтому актуален поиск бактерий, способных эффективно использовать нефтепродукты в условиях высоких широт.

Объектами исследования были штаммы *Pseudomonas frederiksbergensis* Ar-K7, *Rhodococcus globerulus* Ar-K9 и *Arthrobacter alpinus* Ar-K10, выделенные из проб почв, острова Земля Александры архипелага Земля Франца-Иосифа на территории Национального парка «Русская Арктика» в 2019 г. На площадке, где отбирались пробы, до 2015 г. размещались склады горюче-смазочных материалов.

Целью работы было определение способности исследованных штаммов к росту на различных нефтепродуктах при низких температурах и оценка их биотехнологического потенциала для очистки почв от углеводородных загрязнений.

Исследованные штаммы росли при температуре $-1.5 - 37^{\circ}\text{C}$ и содержании NaCl 0 – 70 г/л, использовали широкий спектр субстратов, включающий сахара, летучие кислоты, спирты и биополимеры.

Штаммы *P. frederiksbergensis* Ar-K7, *R. Globerulus* Ar-K9, *A. Alpinus* Ar-K10 были способны к росту на нефти при температуре -1.5°C . Штамм Ar-K7 показал активность относительно среднецепочечных *n*-алканов нефти (C₁₆–C₂₂). Штамм Ar-K9 биodeградирует короткоцепочечные алканы (C₁₁–C₁₃). Штамм Ar-K10 использует средне- и длинноцепочечные *n*-алканы.

Для оценки биотехнологической значимости штаммов был поставлен модельный эксперимент по очистке песка от нефтяных загрязнений в условиях Арктического региона. Штаммы *P. frederiksbergensis* Ar-K7, *R. globerulus* Ar-K9, *A. Alpinus* Ar-K10 культивировали в течение 60 суток при температуре 9°C . Штаммы использовали алифатическую фракцию нефти при 9°C , особенно среднецепочечные (C₁₆–C₂₄) и длинноцепочечные алканы (C₂₄–C₃₀). Наибольшую степень биodeградации продемонстрировал штамм Ar-K9, на 60-е сут. культивирования остаточное содержание *n*-алканов с длиной цепи до C₂₆ составляло менее 10%.

Исследованные штаммы можно рекомендовать для биоремедиации нефтезагрязненных экосистем Арктического региона.

АДАПТАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ VERO К РОСТУ В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЕ

Мажед Ж.Х., Мотов А.С., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Синюгина А.А.

ФГАНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия

mazhed_zh@chumakovs.su

Введение. Сыворотка крови является одним из основных и дорогих компонентов при культивировании клеточной культуры Vero. В ее состав входят неорганические макро и микроэлементы, белки, липиды, факторы роста и вещества, ингибирующие действие трипсина. Несмотря на то, что обеспечивается высокая урожайность клеточной культуры, использование сыворотки имеет ряд недостатков, а именно: вариабельность состава; сложность стандартизации; наличие большого количества балластных веществ, уменьшающих выход целевого продукта; риск микробных и вирусных контаминаций, цена

Цель: получить клеточную культуру Vero, адаптированную к росту в бессывороточной среде.

Материалы и методы. Клеточная культура Vero, выращенная в питательной среде Игла MEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») с добавлением 5% сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия). В качестве основы для бессывороточной среды была использована среды ДМЕМ/Ф12 («ПанЭко», Россия). Компоненты заменяющие сыворотки: ингибитор трипсина из плодов сои («ПанЭко», Россия), инсулин рекомбинантный человеческий («ПанЭко», Россия), альбумин человеческий («Takeda», Япония). Культивирование производилось во флаконах с площадью поверхности 25 см² (Corning) в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C.

Содержание сыворотки уменьшалось при каждом субкультивировании в начале эксперимента с шагом 2,5 %, затем 1%. После достижения 1% сыворотки в среде шаг уменьшили до 0,1 %. При достижении 0,4% в среду добавляли инсулин рекомбинантный человеческий (4 мг/л), альбумин человеческий (3 мкл 30% раствора на 1 мл среды) и ингибитор трипсина из плодов сои (0,5 г/л)

Результаты. Клеточная культура Vero была успешно адаптирована к росту в среде ДМЕМ/Ф12 без сыворотки и с добавлением вспомогательных компонентов. Содержание сыворотки было успешно снижено с 5% до 0 %, а добавление вспомогательных веществ обеспечило полноценный клеточный рост и их деление. При производстве инактивированных вакцин, где в качестве культуры-продуцента применяются клетки Vero, использование адаптированной культуры позволит существенно сократить количество балластных компонентов, расходы на производство и очистку

Выводы. Плавное снижение концентрации сыворотки в питательной среде и добавление компонентов, заменяющих сыворотку, позволяет получить клеточную культуру Vero, адаптированную к росту в бессывороточной среде. Скорость образования монослоя при этом остается прежней и составляет 48 часов при посадочной дозе 2×10^5 кл/мл.

АКТИНОМИЦЕТЫ – ПРИРОДНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ

Макарова А.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт»,
Пушино, Россия

alinavm19@gmail.com

Актиномицеты – грамположительные бактерии, образующие стабильные и устойчивые популяции в различных экосистемах, – являются богатым источником вторичных метаболитов с разной биологической активностью, в том числе антибиотиков. По прогнозам аналитиков ВОЗ к 2025 году многие антибактериальные средства потеряют свою эффективность, а к 2050 году резистентность штаммов приведет к увеличению общей смертности на десять миллионов случаев в год. Поэтому поиск новых антибиотиков или более глубокое исследование уже известных субстанций являются актуальными подходами, позволяющими осуществлять эффективный контроль над патогенами.

Целью работы было раскрытие биотехнологического потенциала актиномицетов, продуцирующих малоизученные антибиотики, выделенных из различных почв на территории России.

В ходе широкомасштабного скрининга почв России по обнаружению актиномицетов-продуцентов антибиотиков с привлечением возможностей «гражданской науки» были обнаружены штаммы, синтезирующие анголамицин – антибиотик макролидной природы, впервые описанный Корбазом в 1955 году, механизм действия которого, однако, остается не вполне ясным.

Выявление и определение механизма антибиотического действия проводилось с помощью репортерных штаммов *E. coli*: dtolc и lptd, содержащих плазмидную конструкцию pDualrep2, которая позволяет обнаруживать сходные по механизму действия, но разнообразные по строению антибиотики. По результатам оценки ингибирования роста репортерных штаммов были отобраны актиномицеты, вызывающие экспрессию флуоресцентного белка Katushka2S, что свидетельствует о нарушении работы рибосомы. Активные продуценты выращивались глубинным культивированием, затем ферментационную жидкость очищали твердофазной экстракцией с использованием сорбента LPS500-H, выявляли активную фракцию с помощью ВЭЖХ и затем определяли массы активных соединений методом масс-спектрологии.

В процессе работы были отобраны два штамма с выраженным механизмом ингибирования трансляции. Проведено секвенирование гена 16s рРНК данных микроорганизмов, описаны культуральные и морфологические признаки, в том числе характер поверхности спор при помощи сканирующего электронного микроскопа. На основании полученных данных была выдвинута гипотеза о том, что оба штамма принадлежат к виду *Streptomyces phaeochromogenes* и продуктом биосинтеза является антибиотик – анголамицин.

Данный антибиотик обладает ценным биотехнологическим потенциалом благодаря повышенной антимикробной активности против грамположительных бактерий.

АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА NP ВИРУСА ГРИППА А ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ИХ ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ

Меркурьев А.В.^{1,2}, Меженская Д.А.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ),
Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

merkurev.2001@mail.ru

Вирус гриппа представляет серьезную угрозу для людей, вызывая ежегодно эпидемии по всему миру. Они обусловлены его частой изменчивостью, которая реализуется геномной реассортацией и ошибками в работе вирусной полимеразы. Это приводит к уходу гриппа от выработанного человеком иммунитета. Наиболее эффективным методом по предотвращению распространения вируса является вакцинация. Но вакцины текущего поколения не могут обеспечить эффективную защиту людей от заражения гриппом и требуют регулярного обновления состава. Такие вакцины нацелены на поверхностные белки – гемагглютинин и нейраминидазу, которые подвержены частой изменчивости.

Альтернативным подходом по предотвращению распространения вируса гриппа является создание универсальных вакцин с широким спектром действия, которые индуцируют усиленный иммунный ответ против консервативных участков вируса. В таком случае реализуется защита организма в случае заражения измененным вариантом вируса. В состав таких вакцин в качестве целевого белка может входить ядерный белок (NP) вируса гриппа, который регулирует процесс репликации цепей РНК внутри зараженной клетки, а также входит в состав рибонуклеопротеиновых комплексов внутри нуклеокапсида. Однако, в литературных данных мало внимания уделяется эволюционным особенностям белка NP, которые могли бы в дальнейшем значительно ускорить процесс создания универсальной гриппозной вакцины на основе этого белка.

В данной работе была исследована изменчивость нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок NP. Для этого были проанализированы все имеющиеся последовательности гена NP вируса гриппа А человека, свиней и птиц из базы данных legacy.fludb.org. Было построено филогенетическое дерево, которое выявило присутствие в циркуляции трёх основных линий, относящихся к основным переносчикам вируса гриппа А. Количественный анализ встречаемости нуклеотидов выявил преобладание аденина по сравнению с остальными нуклеотидами. Однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки на множественное сравнение показал существенное различие средних значений в распределении нуклеотидов между линиями. Также было подсчитано распределение между нуклеотидами относительно позиции в триплете.

Анализ динамики изменчивости гена NP выявил необходимость разделения общей филогенетической линии птиц на три различные подгруппы, что было также подтверждено после использования популяционного теста Таджимы. В результате анализа всех филогенетических линий были получены значения скоростей изменчивости гена NP.

В результате было показано, что ядерный белок вируса гриппа А эволюционно стремится к укреплению существующих мутаций. Последовательности подвергаются высокой изменчивости в штаммах, переносимых свиньями и особенно птицами, которая приводит к появлению отдельных подгрупп внутри одной группы. У человека варианты характеризуются низкой динамикой и консервативностью.

МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI*, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ОТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ

Михайловская В.С., Кузнецова М.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского
федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия

veranikamihailovskaja@yandex.ru

Широкое применение антибиотиков в сельском хозяйстве привело к распространению *Escherichia coli* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Такие микроорганизмы являются источником генов резистентности для внутри- и межвидового обмена посредством горизонтального переноса. Мультирезистентные патогены могут не только вызывать вспышки заболеваний сельскохозяйственных животных, но и передаваться человеку непосредственно при контакте или через пищевые продукты.

Методы. Были изучены штаммы *E. coli* (n=72), выделенные из фекалий сельскохозяйственных животных предприятий и частных фермерских хозяйств Пермского края. Культуры тестировали диско-диффузионным методом на чувствительность к 13 антибиотикам. МЛУ была определена как нечувствительность штаммов к трем и более группам антибиотиков. Для выявления механизмов устойчивости культуры с МЛУ были протестированы методом ПЦР на присутствие основных генов резистентности.

Результаты. Фенотип МЛУ имели 26,4% культур. В двух случаях была зафиксирована крайне высокая резистентность (XDR). Штаммы с фенотипом МЛУ содержали гены следующих бета-лактамаз: *bla_{TEM}* (89,5%), *bla_{CTX-M}* (52,6%), *bla_{SHV}* (36,8%). Нечувствительность к тетрациклину чаще была опосредована системами активного выведения TetA (57,9%) и TetB (10,5%), реже амплифицировали ген *tetM* (5,3%), кодирующий белки защиты рибосом. Устойчивость к хлорамфениколу была обусловлена системой эффлюкса, кодируемой геном *cmIA* (42,1%), либо – продукцией хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (26,3%). Гены устойчивости к фторхинолонам *qnrB* и *qnrS*, кодирующие белки защиты ДНК-гиразы и топоизомеразы, амплифицировали с равной частотой (10,5%). У 15,8% культур обнаружен ген фермента, модифицирующего норфлоксацин и цiproфлоксацин (*aac[6']-Ib-cr*). Важно отметить, что детектированные гены чаще располагаются на плазидах и могут передаваться от комменсальных бактерий патогенным путем горизонтального переноса. В связи с этим, молекулярный анализ мультирезистентных *E. coli* в популяции сельскохозяйственных животных является важной частью ветеринарного и эпидемиологического надзора за антимикробной резистентностью.

Работа выполнена при поддержке правительства Пермского края по гранту №С-26/541 и государственному заданию НИОКТР АААА-А19-119112290009-1.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК АМИДАЗОСОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИЙ НА ТЕРМОРАСШИРЕННОМ ГРАФИТЕ

Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского
федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия

19mochalova96@mail.ru

Иммобилизованные бактериальные клетки, обладающие высокой амидазной активностью, находят свое применение в ферментативном синтезе для получения разнообразных соединений, биодegradации, очистке сточных вод, создании биопрепаратов. Они могут быть использованы в качестве биоселектирующего элемента биосенсора, благодаря селективности, надежности, возможности повторного использования и легкой интеграции в портативные устройства.

Помимо основных способов клеточной иммобилизации (адсорбции, ковалентной сшивки, включения, инкапсуляции), микробные биосенсоры могут быть созданы на основе бактериальных биопленок, являющихся самоиммобилизованными сообществами.

Одним из материалов, который может использоваться в микробных биосенсорах и биотопливных элементах, является терморасширенный графит (ТРГ), обладающий высокой электропроводностью, большой удельной поверхностью, химической стойкостью и биосовместимостью, способностью принимать различные формы, что важно для конструирования электродов.

Цель исследования – изучение влияния иммобилизации клеток бактерий, выращенных на терморасширенном графите, на амидазную активность и операционную стабильность иммобилизованного биокатализатора.

В работе были использованы амидазосодержащие штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *Alcaligenes faecalis* 2. Клетки бактерий иммобилизовали на терморасширенном графите двумя способами: адгезией из выращенной культуры и выращиванием биопленок на поверхности материала. Амидазную активность определяли в ходе реакции трансформации 100 мМ раствора акриламида в акриловую кислоту. Операционную стабильность биокатализаторов оценивали по количеству образованной кислоты при последовательном проведении полной конверсии субстрата, вносимого в каждом цикле в реакционную среду. Время полного цикла составляло 24 ч.

Установлено, что амидазная активность биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ сохранялась на протяжении 29 проведенных циклов, а *R. erythropolis* 4-1 – 5 циклов. Выявлено, что наибольшее количество акриловой кислоты при трансформации акриламида биокатализатором на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2 на 0,5 г графита и составляет 100–130 мг в отличие от *A. faecalis* 2 (80–100 мг). Наименьшее количество кислоты (1–3 мг) продуцировали биопленки *R. erythropolis* 4-1. Амидазная активность адгезированных на ТРГ клеток бактерий сохранялась на протяжении 7-ми циклов. При этом наибольшее количество акриловой кислоты синтезировали родококки – 7–8 мг на 0,5 графита, наименьшее – алкалигенес (1–2 мг).

Таким образом, биопленки *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ могут являться гетерогенными биокатализаторами и использоваться в качестве биологического элемента

биосенсора, а также применяться для других биотехнологических целей. Адгезия относится к простому способу клеточной иммобилизации, однако для него характерно постепенное вымывание клеток при многократном использовании. Поэтому этот метод может быть применим тогда, когда нет необходимости в длительной эксплуатации иммобилизованного биокатализатора и достаточно слабого прикрепления клеток к материалу носителя.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗИНА ФАГА 3 *AEROMONAS*

Мусаева А.А.^{1,2}, Чернышов С.В.¹, Прохоров Д.А.³, Микулинская Г.В.^{1,2}

¹Филиал Института биоорганической химии РАН, Пушино, Россия

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

musaeva_ayajan@mail.ru

Эндолизин – это деградирующие пептидогликан (ПГ) ферменты, которые позволяют фаговому потомству по завершении созревания покинуть бактериальную клетку. Эндолизин при воздействии на клеточную стенку извне могут вызывать лизис бактерий. Большой интерес исследователей к эндолизинам связан именно с их антибактериальными свойствами.

Рекомбинантный эндолизин фага 3 *Aeromonas sp.* был получен путем продукции искусственного гена с плазмиды на основе рЕТ28а в клетках *E. coli* BL21(DE3). Белок с максимальной удельной активностью 4482 ± 299 ед/мг был очищен хроматографически с помощью Тоурепарл DEAE 650М и фосфоцеллюлозы. Были определены оптимальные условия работы фермента: концентрация Трис-НСI-буфера 25-50 мМ, рН от 8,5 до 9,5. Фермент оказался кальций-зависимой пептидогликангидролазой: после ингибирования специфическим хелатором ВАРТА активность полностью восстанавливалась при добавлении ионов $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$. Фермент термолabile и необратимо инактивируется при температуре выше 50°C. Изучение структуры белка в растворе показало, что фермент в апоформе (без ионов) имеет выраженное гидрофобное ядро, плотность упаковки которого увеличивается при связывании иона Zn^{2+} . Дальнейшее присоединение иона кальция окончательно стабилизирует пространственную структуру этого глобулярного белка.

Анализ спектра антибактериального действия фермента вели, исследуя его способность лизировать бактерии с ПГ различной структуры. Клетки стационарных культур грамотрицательных бактерий видов *Escherichia coli* B, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pectobacterium carotovorum*, чей ПГ относится к типу А1γ, эффективно лизировались: удельная активность составляла 1100-1300 ед/мг. Фермент деградировал также живые клетки экспоненциальных культур грамположительных бактерий с ПГ типа А1γ: *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* (80-110 ед/мг), *B. Megaterium* (9 ед/мг). Не подверженными лизису ферментом оказались клетки *B. cereus* (ПГ типа А1γ, но клеточная стенка укреплена белками и полисахаридами), *Staphylococcus aureus* (ПГ типа А3α), *Micrococcus luteus* (А2), *Terrabacter tumescens* (А3γ). Таким образом, было показано, что фермент специфичен к ПГ типа А1γ грамотрицательных бактерий и бацилл

КОМБИНИРОВАННЫЕ ДЕЗИНФЕКТАНТЫ ПРОТИВ МУЛЬТИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК

Неволина Е.Д.^{1,2}, Журина М.В.¹

¹Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Москва, Россия

katia.nevolina@yandex.ru

Биопленки являются серьезной проблемой в пищевой промышленности. Благодаря своей сложной структуре и образованию внеклеточного полимерного матрикса, биопленки обладают повышенной устойчивостью к действию дезинфектантов. Поэтому необходимо создание новых комбинированных дезинфектантов.

Цель нашей работы – создание комбинированных дезинфектантов для эффективного подавления мультивидовых биопленок. В нашей работе был исследован широкий диапазон концентраций дезинфектантов – этилового спирта и перекиси водорода на 12 штаммах микроорганизмов, выделенных с мясоперерабатывающего производства. Все культуры показали снижение жизнеспособности клеток в составе моновидовых биопленок в результате воздействия дезинфектантов. Например, *Pseudomonas libanensis* и *Carnobacterium maltaromaticum*, для которых были выбраны частично подавляющие жизнеспособность клеток в составе моновидовых биопленок концентрации: *P. libanensis* этанол в концентрации 15%, 20%, 25% подавляющий на 3%, 24% и 31% соответственно и перекись водорода 0,38% и 0,75% подавляющий на 22% и 13% и *C. maltaromaticum* этанол в концентрации 15%, 20%, 25% подавляющий на 2%, 3% и 14% соответственно и перекись водорода 0,38% и 0,75% подавляющий на 22% и 23% соответственно. При дальнейшем исследовании эффективности комбинированных дезинфектантов на бинарные биопленки показано, что при обработке зрелых бинарных биопленок *P. libanensis* и *C. maltaromaticum* (72 часа) смесью этилового спирта (20%) и перекиси водорода (0,75%) количество жизнеспособных клеток снизилось до 34% от контроля. В случае этилового спирта и перекиси водорода подавление жизнеспособности клеток в составе бинарных биопленок *P. libanensis* и *C. maltaromaticum* составляла 91% и 42% соответственно.

Таким образом, совместное действие дезинфектантов на мультивидовые биопленки оказалось более эффективным, чем действие этанола и пероксида водорода по отдельности. В дальнейшем планируется исследование механизма этого явления.

МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ХИЩНОЙ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ
MICROBACTERIUM, ШТ. *Ltr1* – ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ И РОЛЬ
В МЕХАНИЗМЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

**Носков А.Е., Абашина Т.Н., Поливцева В.Н., Шорохова А.П.,
Мачулин А.В., Сузина Н.Е.**

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино, Россия

nosc0w@yandex.ru

С поверхности личинки тритона нами была выделена грамположительная бактерия, которая по своим морфологическим характеристикам и ультраструктурным признакам может быть отнесена к ультрамикробактериям. К таким морфологическим критериям относятся однородность ультрамелких размеров и ультрамалые объёмы всех клеток в популяции (≤ 1 мкм³), независимо от физиологических условий культивирования. Минимализация физических размеров и генома клетки является распространённым эволюционным признаком хищных бактерий, имеющих, как правило, высокий потенциал секреции антимикробных веществ для реализации хищнической стратегии по типу «волчьей стаи» (Wolf pack) или непосредственного контактного взаимодействия с клеткой жертвой по типу одиночной атаки, как это происходит у микроорганизмов группы BALO (*Bdellovibrio* and like organisms).

Новый изолят шт. *Ltr1* обладает выраженной антагонистической активностью, в отношении некоторых грамположительных (представителей родов *Bacillus*, *Micrococcus*), и грамотрицательных бактерий (представителей родов *Pseudomonas*, *Erwinia*).

Экспериментально доказано, что механизм антибактериального действия шт. *Ltr1* основан на воздействии антимикробного агента, инкапсулированного в мембранные везикулы, которые клетки шт. *Ltr1* секретируют в межклеточное пространство в присутствии жертвы. Везикулы, формируются во множественных локусах по всей поверхности цитоплазматической мембраны в виде кратерообразных или мезосомоподобных образований, что визуально детектируется при помощи ТЭМ. Процесс формирования и секреции везикул носит индуцибельный характер, то есть активно инициируется лишь в присутствии бактериической жертвы. При культивировании в монокультуре шт. *Ltr1* ведёт себя как типичный сапротроф и показывает высокие темпы роста на богатых питательных средах. Таким образом, новый изолят шт. *Ltr1* является факультативным хищником.

Наличие антибактериальной активности описано у представителей вида *M. paraoxydans* впервые, также впервые обнаружена способность к формированию мембранных везикул и описан механизм их формирования у грамположительных бактерий рода *Microbacterium*.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ФЛАВИПОДОБНЫХ ВИРУСОВ

Охезин Е.В.^{1,2}, Литов А.Г.¹

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический
факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия

oe-74@mail.ru

Недавно была открыта уникальная родственная роду *Flavivirus* вирусная группа Джангменвирусов. Предполагают, что они являются арбовирусами – вирусами, циркулирующими между позвоночными хозяевами с помощью беспозвоночных переносчиков. Геном этих вирусов представлен 4 сегментами одноцепочечной РНК позитивной полярности, кодирующими РНК-зависимую РНК-полимеразу и хеликазу, имеющие высокую степень гомологии с другими белками известных флавивирусов, а также белки уникальные для группы Джангменвирусов. Все сегменты экпированы и полиаденилированы. Особый интерес среди представителей флавиподобных вирусов вызывают вирусы Алонгшан и Янгоу, ввиду того, что отмечена их широкая циркуляция, в том числе на территории Российской Федерации в таких регионах как Калининградская, Ульяновская, Челябинская области, Республики Татарстан, Тыва и Алтай. Кроме того, вирус Алонгшан выявлен в сыворотках больных пациентов, т.е. может представлять потенциальную угрозу благополучию и здоровью человека.

Последовательности концевых нетранслируемых областей (НТО) генома и их высококонсервативные вторичные структуры играют ключевую роль в фундаментальных процессах жизненного цикла вирусов. Получение подобной информации о последовательностях НТО требует применение специальных методик и подходов. Для Джангменвирусов подобные данные о НТО вообще отсутствуют. Изучение концевых структур необходимо для понимания фундаментальных механизмов репликации, транскрипции и биосинтеза белка Джангменвирусов.

Целью исследования стало секвенирование 5' и 3' концов этих участков генома вируса Алонгшан и Янгоу, поиск консервативных последовательностей и моделирование вторичной структуры РНК данных участков. Для этого вирусы Алонгшан и Янгоу размножали в культуре клеток клещей, проводили выделение тотального препарата РНК из культуральной жидкости. При синтезе комплементарной цепи ДНК использовали адаптеры, специфичные к поли-А последовательности, а буфер модифицировали для индукции нематричного добавления ревертазой олиго-С на 3' конце синтезируемой цепи. Далее проводили ПЦР с использованием адаптер- и вирус-специфичных олигонуклеотидов отдельно для 5' и 3' концов. В итоге были получены ПЦР-продукты концов всех 4 сегментов 5 и 7 штаммов вируса Алонгшан и Янгоу, соответственно, которые были отсекуены.

На основании полученных данных было проведено выравнивание последовательностей, которое показало, что все сегменты имеют 100% консервативность первых шести нуклеотидов (АГУУАА) на 5' конце как для вируса Алонгшан, так и для вируса Янгоу. Нуклеотиды в позиции 28-36 (ГЦААГУГЦА), Г40 и 60-62 (ГАЦ) также были на 100%

консервативны. Моделирование вторичной структуры РНК показало, что две пары ГЦ в позиции 28-36 способствуют образованию ААГУ тетрапли. Также выравнивание последовательностей и моделирование структур РНК всех сегментов обоих вирусов на 3` конце продемонстрировало 100% консервативность нуклеотидов ЦААГУГ в позициях 354 – 359 и 372 – 377 и формирование двух ААГУ тетрапетель.

Работа поддержана грантом РФФ №21-74-00083.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОТХОДОВ ЦЕЛЛЮЛОЗНО- БУМАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА С ПОМОЩЬЮ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Плетнева С.К.¹, Самойлова З.Ю.²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал Пермского ФИЦ,
Пермь, Россия

pletneva.sofia@mail.ru

Одной из ведущих отраслей народного хозяйства является целлюлозно-бумажная промышленность, выпускающая различные виды волокнистых полуфабрикатов, бумагу, картон и изделия из них. По степени воздействия на окружающую среду эта отрасль остается в числе проблемных из-за большого числа токсичных выбросов и экологической опасности для природной среды. Следовательно, проблема вторичного использования побочных продуктов целлюлозно-бумажного производства является актуальной.

Лесопромышленные отходы обычно не очень ценятся и выбрасываются или же сжигаются, хотя они могут быть выгодным источником соединений с высокой добавленной стоимостью. Ценность остатков древесной биомассы увеличивается за счет метаболитов, которые присутствуют в меньшем количестве по сравнению с целлюлозой, гемицеллюлозой и лигнином. Эти экстрактивные соединения включают в себя фенольные соединения, представляющие собой перспективное сырье для пищевой и фармацевтической промышленности благодаря антиоксидантным, антимикробным, противовоспалительным и противоопухолевым эффектам, которые они проявляют.

Изучение биологической активности отходов целлюлозно-бумажной промышленности и их отдельных компонентов (кверцетина, галловой кислоты, таннинов и др.) с помощью микробных тест-систем в сочетании с батареей физико-химических методов анализа является современным биотехнологическим подходом, который позволяет выявить ценные свойства указанных соединений и их смесей на живых, безопасных, относительно дешево и легко культивируемых генно-инженерных непатогенных штаммах бактерий *Escherichia coli*. Целью данной работы явилось изучение биотехнологического потенциала экстрактов целлюлозно-бумажной промышленности с использованием непатогенного штамма *E. coli* BW25113. Экстракты №1 (гексановый, надосадочная жидкость), №2 (гексановый, осадок) и №3 (этилацетатный), полученных из отвалов коро-древесных остатков, были предоставлены сотрудниками Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

На первом этапе проводили физико-химическую оценку свойств экстрактов. Установлено, что в испытуемых экстрактах общее содержание полифенольных соединений варьирует от 46 ± 2 (экстракт №2) до 74 ± 3 (экстракт №1) мг-экв галловой кислоты/мл.

Известно, что фенольные соединения способны проявлять прямое антиоксидантное действия за счет связывания свободных радикалов. В наших условиях, в тесте с DPPH связывающую активность испытуемых экстрактов оценивали по величине IC_{50} , обозначающей концентрацию экстракта, при которой происходит связывание 50% радикалов в тест-системе (чем ниже показатель, тем выше антиоксидантная активность *in vitro*). Значения IC_{50} составили 18.8 ± 0.8 , 22 ± 1.0 и 11 ± 0.9 мг/мл, соответственно, для экстрактов №1, №2 и №3. Полученные значения сравнивали с таковыми для кверцетина (0.6 ± 0.06 мг/мл) и стандартного антиоксиданта Trolox (0.6 ± 0.04 мг/мл). Таким образом, экстракт №3 обладал наибольшей радикал-связывающей активностью среди испытуемых экстрактов, однако он оказался слабее кверцетина и Trolox в 18 раз.

Предварительная оценка противомикробных свойств испытуемых экстрактов дисковым методом показала зоны лизиса величиной 4 ± 1 мм в присутствии экстрактов №1 и №2. Проводится дальнейшее изучение биологической активности испытуемых экстрактов. Работа выполнена в соответствии с госзаданием АААА-А19-119112290009-1.

БИОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ФАКУЛЬТАТИВНО МЕТИЛОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS*

Побережный Д.Ю.¹, Ванюшенкова А.А.¹, Белов А.А.¹, Складнев Д.А.², Калёнов С.В.¹

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, факультет биотехнологии и промышленной экологии, кафедра биотехнологии, Москва, Россия

²Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория выживаемости микроорганизмов, Москва, Россия

poberezhnyi1@gmail.com

Разработка процесса «зелёного» синтеза монодисперсных наночастиц металлов с использованием микроорганизмов является актуальной задачей современной биотехнологии. Большинство работ по данной теме посвящены биосинтезу наночастиц гетеротрофами, культивируемыми на комплексных питательных средах, включающих различные гидролизаты и экстракты в качестве источников биогенных элементов и ростовых факторов. Многочисленные и разнообразные компоненты комплексных питательных сред, а также их трансформанты и прочие внеклеточные продукты сложного метаболизма гетеротрофов, зачастую выполняют неопределенную роль при восстановлении катионов металлов и формировании наночастиц, что непредсказуемо сказывается на процессе биосинтеза наночастиц в целом.

Нами предлагается использовать метилотрофные микроорганизмы как основу для разработки технологии синтеза биогенных наночастиц металлов, в частности серебра. Благодаря специфике метаболизма многие метилотрофы характеризуются пониженными требованиями к ростовым факторам, что позволяет использовать простые синтетические

среды для проведения биотехнологических процессов синтеза наночастиц. Доступность субстратов, таких как метанол и его производные, используемых в качестве единственного ростового субстрата, обуславливает экономическую привлекательность применения C_1 -утилизирующих микроорганизмов для синтеза биогенных наночастиц серебра.

В рамках данного исследования нами были выделены и охарактеризованы бактерии *Rhodococcus erythropolis*, способные потреблять метанол в качестве единственного источника углерода и осуществлять внеклеточный биосинтез наночастиц серебра. Качественная оценка биосинтеза наночастиц полученным изолятом производилась спектрофотометрически. В зависимости от условий культивирования продуцента и синтеза, максимум поглощения раствором наночастиц наблюдался при длинах волн в диапазоне 390–420 нм. Большинство получаемых коллоидов имели максимум поглощения при длинах волн 410–412 нм. Подобные коллоидные растворы отличались высокой стабильностью и сохраняли свои свойства на протяжении нескольких месяцев. С использованием рентгеноструктурного анализа было установлено, что полученные наночастицы содержат металлическое серебро. Методами динамического рассеяния света и сканирующей электронной микроскопии была произведена оценка размеров наночастиц: диаметр полученных наночастиц варьировался от 20 до 100 нм с преобладанием 20–40 нм частиц. Просвечивающая электронная микроскопия позволила оценить диаметр металлического ядра, который варьировался в диапазоне 5–25 нм. Продуцируемые *R. erythropolis* наночастицы серебра обладают выраженными бактерицидными свойствами и способны подавлять рост *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *B. cereus*.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАГЕНОМОВ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ КОШЕК И СОБАК

Пролович Е.О.¹, Вартпатрикова Н.А.¹, Бобровский Д.М.², Тутукина М.Н.²

¹ГБОУ школа имени Маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия

²Сколтех, Москва, Россия

³École polytechnique fédérale de Lausanne, Лозанна, Швейцария

Eva.provolovich@gmail.com

В настоящее время у многих людей есть домашние животные, и интересно оценить, насколько пересекаются между собой микробиомы животных и их хозяев, а также оценить различия в микробиомах кошек и собак. Метагеномный подход позволяет оценить разнообразие бактерий в природных образцах, не выделяя и отдельно не выращивая их, потому что не все бактерии являются культивируемыми. Цель нашей работы – изучить и сравнить метагеномы ротовой полости собак, кошек и хозяев, выявить корреляцию между бактериями и образом жизни питомцев, определить какие бактерии составляют основу микрофлоры ротовой полости животных и человека, а какие могут представлять опасность для людей.

Были собраны образцы из ротовой полости у животных и из носовой полости у их хозяев. Затем из образцов была выделена ДНК, и с помощью ПЦР был амплифицирован переменный участок V4-V5 16S рРНК (515F – 907R). Чтобы избежать стадии лигирования адаптеров Illumina, были взяты праймеры с уже добавленными адаптерами. Ампликоны были

очищены и использованы для приготовления библиотек. Затем все образцы были отсеквенированы на платформе Illumina MiSeq в ЦКП Геномики Сколтех. После получения данных они были обработаны биоинформатически с помощью кода, написанного на языке Python, и визуализированы с помощью программы Qiime 2.

Было показано, что микробиомы образцов, взятых у кошек и собак, статистически различаются, при этом они кластеризуются между собой. На таксономической диаграмме можно наблюдать сходство между образцами, взятыми у людей и кошек, по бактериям порядков *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* и *Lactobacillales*, что объяснимо тем, что большинство кошек являются домашними. В образцах, взятых у собак, наблюдаются бактерии порядков *Clostridiales*, *Fusobacteriales*, *Pasteurellales* присутствующих в почве, воде, растениях. Также встречаются представители порядка *Pasteurellales*, находящиеся в верхних дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте животных. Некоторые виды этих бактерий патогенны и могут вызывать поражения сердечно-сосудистой и дыхательной систем у человека, которого поцарапал носитель (собака). Во всех образцах выявлено наличие *Bacteroidales*, которые являются представителями микрофлоры толстого кишечника человека, желудочно-кишечного тракта животных, проявляющие антагонистическую активность по отношению к сальмонеллам, шигеллам, эшерихиям. Но также они устойчивы к широкому спектру антибиотиков, что вызывает опасения, так как они могут стать резервуаром для устойчивости других более патогенных бактерий. Но в целом, можно сказать, что большинство бактерий, присутствующих в ротовой полости домашних питомцев абсолютно безвредны для человека.

РАЗЛОЖЕНИЕ ФТАЛЕВЫХ КИСЛОТ ШТАММОМ *PAENARTHROBACTER* SP. SA101

Прохорова А.П.², Ястребова О.В.¹, Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ
УрО РАН, Пермь, Россия

liprohorova@yandex.ru

Фталаты – соли и эфиры *орто*-фталевой кислоты (ОФК), изомерами которой являются изофталевая и терефталевая кислоты (ТФК), широко используются в качестве пластифицирующих добавок в производстве пластмасс, в частности поливинилхлорида, для улучшения их механических свойств, гибкости, морозостойкости. Сложные эфиры терефталевой кислоты используются для изготовления полиэфирных волокон, пищевых пленок и полиэтилентерефталата, известного как материал для производства пластиковых бутылок. Широкое применение фталатов в промышленности делает актуальной проблему утилизации данных соединений. Микробная деградация является перспективным, экономичным и экологически безопасным методом элиминации фталатов.

Цель работы – изучение способности штамма *Paenarthrobacter* sp. SA101 разлагать высокие концентрации ОФК и ТФК. Штамм SA101 выделен из образца сточных вод химического предприятия (г. Пермь) и идентифицирован как представитель рода *Paenarthrobacter*, близкородственный *Paenarthrobacte rureafaciens* NC^T (NR 029281) (уровень

сходства по гену 16S рРНК составлял 99,3%). Способность штамма использовать в качестве единственного источника углерода и энергии ОФК и ТФК (в концентрациях 1, 10, 20, 30 г/л) проверяли при росте в минеральной среде К1. Установлено, что штамм SA101 растет на данных субстратах в концентрациях до 20 г/л, что для представителей рода *Paenarthrobacter* показано впервые. Увеличение концентрации обоих субстратов приводило к накоплению биомассы, при этом в средах с ОФК зафиксированы более высокие параметры роста штамма чем в средах с ТФК. Максимальное значение ОП₆₀₀ (1,64), наиболее высокая удельная скорость роста ($0,07 \pm 0,003 \text{ ч}^{-1}$) и наименьшая продолжительность лаг-фазы роста штамма наблюдались в среде с 10 г/л ОФК. При выращивании штамма на 20 г/л ТФК наблюдались наиболее высокие удельная скорость роста ($0,03 \pm 0,002 \text{ ч}^{-1}$) и максимальное значение ОП₆₀₀ штамма (1,6) на данном субстрате, однако подготовительная фаза роста была продолжительней, чем в среде с 10 г/л ТФК.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

КОЛЬЧАТЫЙ ПАТТЕРН В БЛЯШКАХ УМЕРЕННОГО СЕРОКОНВЕРТИРУЮЩЕГО КОЛИФАГА Hf4S

Пушкина Н.И., Летарова М.А., Летаров А.В.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, ИНМИ РАН, Москва, Россия

natalia.pushkina00@mail.ru

Вирусы бактерий (бактериофаги, или фаги) – постоянные спутники микробных сообществ, регулирующие их структуру и состав. Влияние бактериофагов на популяции бактерий связано с избирательной гибелью клеток, которая может зависеть от штамма бактерии, физиологического состояния, наличия в среде сигнальных веществ, дозы фага и многих других факторов. В случае успешного заражения умеренным вирусом даже чувствительные клетки способны выживать, выбирая лизогенный путь инфекции. Немаловажно, что лизогенизация может предоставлять бактериям различные преимущества, в том числе сероконверсию, защищающую от других вирусов.

Умеренный подовирус Hf4s, выделенный из кишечника лошадей, способен к сероконверсии своего хозяина – *E. coli* 4s, благодаря чему лизогены становятся нечувствительны к некоторым другим фагам. Кроме того, на газоне штамма-хозяина вирус образует бляшки, содержащие серии чётко различимых колец из микроколоний лизогенов, разделённых зонами лизиса. Избирательная гибель клеток связана с пространственной или временной осцилляцией фактора, влияющего на выбор лизогенного решения.

Чтобы выяснить причину осцилляций, мы отобрали и подсчитали лизогены, для чего ввели в геном Hf4s ген устойчивости к канамицину. Мы выяснили, что при смешивании суспензии клеток с вирусом наблюдается зависимость частоты лизогенизации от множественности инокуляции фагового лизата: при соотношении фаг/бактерия около 1 лизогенизация примерно в 40 раз менее вероятна, чем при соотношении фаг/бактерия около 8. Лизат, очищенный от вируса центрифугированием, практически не влияет на частоту лизогенизации; время нанесения вирусной суспензии на растущий газон также не приводит к

осциллирующему изменению частоты лизогенизации микроколоний. Всё это указывает на то, что кольчатый паттерн в бляшках Hf4s может формироваться благодаря пространственным колебаниям локальной концентрации вируса в агаре.

Несмотря на очевидную зависимость частоты лизогенизации от содержания фагового лизата в нашей системе, роль подобной стратегии в экологии бактериофага Hf4s и конкретные молекулярные механизмы принятия лизогенного решения требуют дальнейших исследований.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИСЕПТИКОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПЕРИИМПЛАНТИТЫ

**Речкина В.И.¹, Страндстрем Е.Б.², Звонарев А.Н.¹, Арсенюк А.Ю.^{3,4},
Владимирская О.С.⁵, Ефимов Б.А.², Копецкий И.С.², Щербакова В.А.¹, Васильев А.В.⁵**

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

³Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, ФНЦ Всероссийский
НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, Москва, Россия

⁴Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

⁵Центральный НИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Министерства
здравоохранения РФ, Москва, Россия

oshurkova.viktoriya@gmail.com

Заболевания, связанные с воспалением вокруг дентальных имплантатов – периимплантиты – являются частыми и имеют средневзвешенный показатель распространенности 43% в Европе и 22% в Южной и Северной Америке. В микробиоте, связанной с периимплантитом, преобладают хорошо известные пародонтальные патогены, такие как *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* и некоторые другие виды бактерий. В случае периимплантитов эти бактерии образуют биопленки с определенной специфичностью, обусловленные особенностями поверхности титанового дентального имплантата. Для изучения закономерностей формирования биопленок и поиска эффективных способов предотвращения их образования, необходимы экспериментально отработанные методики определения жизнеспособности планктонных бактерий после воздействия антисептиков с учетом необходимости сохранения анаэробноза на каждом этапе проведения экспериментов.

Цель исследования состояла в разработке методических подходов для определения воздействия хлоргексидинабиглюконата (ХГ) в качестве модельного антисептика на выживаемость штаммов анаэробных бактерий, вызывающих периимплантиты.

В качестве объектов исследования нами были использованы *P. gingivalis* штамм 35, *T. forsythia* штамм 22 и *P. intermedia* штамм 13, определенные до вида методом МАЛДИ-ТОФ. Подбор условий культивирования показал, что среда TSA с добавлением гемина и менадиона

является оптимальной для роста всех трех культур, а в середине логарифмической фазы роста клетки не образуют биопленок, что облегчает их учет. Эксперименты по воздействию ХГ проводили в стерильных пробирках Хангейта, предварительно продутых бескислородным азотом. После воздействия ХГ аликвоту культуры анаэробно окрашивали для выявления живых и поврежденных клеток и просматривали на микроскопе Axio Imager A1 (Zeiss, Германия). Полученные результаты показали, что обработка ХГ приводила к полной гибели клеток штаммов *P. intermedia* и *T. forsythia* в концентрации 0,01% и 0,05%, часть популяции клеток этих штаммов выживала после обработки 0,005% ХГ. Клетки *P. Gingivalis* имели неповрежденную мембрану после обработки ХГ даже при концентрации 0,05%. Однако, при пересеве культуры в свежую среду рост наблюдали только после обработки 0,005% ХГ.

Разработанные подходы позволят провести скрининг антисептических средств, способных в полной мере предотвращать рост анаэробных бактерий, индуцирующих развитие перимплантитов.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ПОЛУФАБРИКАТОВ ДРЕВЕСНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ СПИРТОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Родичева М.А.¹, Майорова К.А.¹, Шевченко А.Р.¹, Телицин В.Д.², Аксенов А.С.¹.

¹Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск,
Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
Москва, Россия

rodichevam@yandex.ru

Основную часть органического материала на Земле составляет растительная биомасса, которая является возобновляемым источником энергии с объемом около 2 млрд. тонн. Древесина составляет 10-12% от всей биомассы, и по мере истощения ископаемых углеводородов значимость данного сырья будет только увеличиваться (*Sinitsyn, 2020*). Однако конверсия растительной биомассы в виде твердого материала затрудняется как особенностями строения, так и химическим составом (*Болтовский, 2017*). Биоэкономические модели производства продуктов из древесины в России представлены гидролизным производством и сульфитным способом получения полуфабрикатов. В процессе сульфитной варки образуется щелок, который содержит около 3-3,2% сахаров, с соотношением гексоз к пентозам 1,7 к 1,0. Данный продукт является поточным и подлежит утилизации. Большая часть микробиологической переработки щелоков направлена на получение биоэтанола и кормовых дрожжей (*Новожилов, 1999*). Технологией конверсии лигносодержащего сырья обладают гидролизные производства, где конечными продуктами являются гидролизный этанол, фурфурол, ксилит и другие. Количество образованных сахаров после гидролиза в растворе 2,5-3,5%, с соотношением гексоз и пентоз 2:1. Тем не менее, данный тип гидролиза древесины остается в тяжелом экономическом положении из-за конкуренции с пищевыми источниками углерода (*Rabinovich, 2020*).

На современном этапе развития ресурсосберегающих технологий включение древесины в модель биоэкономики не возможно без предварительной предобработки.

Проведение дополнительной обработки древесины значительно повышает реакционную способность материала (Wu, 2023). Методы сульфитной и сульфатной делигнификации в России являются одними из оптимальных способов подготовки древесного сырья. Ферментативный гидролиз считается наиболее прогрессивным направлением в областях гидролитической деструкции целлюлозосодержащего сырья (Болтовский, 2017). Перспективы, открываемые предобработкой древесины, показывают возможность глубокой биоконверсии полуфабрикатов древесного происхождения, со степенью конверсии близкой к 100%.

Цель данной работы – получение высококонцентрированных гидролизатов из промышленных образцов древесных полисахаридов биокатализаторами российского производства и оценка возможности получения жидких видов биотоплива из них.

Промышленные образцы белой лиственной целлюлозы (ОАО «Архангельский ЦБК») подвергались биоконверсии коммерческими препаратами карбогидраз, продуцируемых рекомбинантным штаммом *Penicillium verruculosum*, без генно-инженерного вмешательства. В исследовании был задействован комплекс универсального действия, с усовершенствованной ксиланазной активностью. Биоконверсию проводили при температуре 50 °С. и концентрации субстрата 5% с расходом биокатализаторов 10 ФБ/г в течение 72 ч. В результате общая степень конверсии достигла 97%, концентрация основных сахаров: глюкозы 40 г/л; ксилозы 11 г/л, и других моносахаридов ~2,5 г/л. Соотношение гексоз и пентоз (4:1) в два и более раз гидролизных производств и сульфитных щелоков, что позволяет рассматривать данный субстрат в качестве перспективного источника углерода для микробиологического синтеза этанола.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 22-24-20136).

РОЛЬ СИСТЕМ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ Z-КОЛЬЦА ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕ SOS-ОТВЕТА У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Румянцева Н.А., Голофеева Д.М., Ведяйкин А.Д.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

rumyanatasha@yandex.ru

Деление является центральным событием в жизни бактериальной клетки. В норме процесс деления начинается с образования Z-кольца посередине клетки с последующим привлечением в сайт деления вспомогательных белков. За правильную локализацию Z-кольца у бактерий *Escherichia coli* отвечают различные системы позиционирования. Наиболее сильной среди систем позиционирования является Min-система. Белки данной системы осуществляют негативную регуляцию Z-кольца: они осциллируют между полюсами клетки и препятствуют образованию мини-клеток без ДНК внутри. Второй системой, осуществляющей негативную регуляцию, является система нуклеоидной окклюзии. Данная система препятствует формированию Z-кольца над областью нуклеоида.

При возникновении повреждений ДНК в клетках *E. coli* активируется защитный механизм – SOS-ответ. Во время SOS-ответа деление клеток блокируется до тех пор, пока повреждения в геноме не будут устранены. После успешной репарации бактерии важно восстановить деление. Процесс активации и развития SOS-ответа изучен довольно хорошо, однако процесс выхода из этого состояния, в том числе возобновление деления, изучены недостаточно подробно.

В данной работе была изучена роль систем позиционирования (Min-системы и системы нуклеоидной окклюзии) в процессе восстановления деления клеток *E. coli* по окончании SOS-ответа. Было установлено, что Min-система играет более важную роль при восстановлении деления, чем система нуклеоидной окклюзии, хотя ранее считалось, что возможно при стрессовых условиях именно система нуклеоидной берет на себя главную роль. Также в ходе работы была осуществлена одновременная визуализация белков FtsZ и MinC, что позволило оценить роль Min-системы в процессе восстановления деления, в том числе локализации первого Z-кольца.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-24-00085.

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИХ ПЕРОКСИДАЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES HIRSUTA* В АСКОМИЦЕТАХ РОДА *PENICILLIUM*

Савинова О.С., Чулкин А.М., Федорова Т.В.

ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

savinova_os@rambler.ru

Лигнолитические пероксидазы (ЛП) – марганец пероксидазы (MnP; КФ 1.11.1.13), лигнин пероксидазы (LiP; КФ 1.11.1.14) и универсальные пероксидазы (VP; КФ 1.11.1.16) – секретлируемые ферменты лигнолитической системы грибов белой гнили. Кодированы обширными мультигенными семействами. Значительно отличаются по своим свойствам, что имеет большое экологическое и биотехнологическое значение, но, возможности их всесторонней характеристики ограничиваются трудностями выделения из нативных продуцентов. Грибы рода *Trametes* – наиболее перспективные объекты изучения, так как секретлируемые ферменты этого гриба могут быть использованы в технологиях биотрансформации различных промышленных отходов.

Аннотация генома *Trametes hirsuta* 072 показала наличие 18 генов ЛП, кодирующих 9 предполагаемых изоферментов LiP, 7 MnP и 2 VP. В предыдущих исследованиях в секретах *T. hirsuta*072 на разных средах детектированы изоферменты VP2, LiP9, MnP2, MnP5 и MnP7 в очень малом количестве. Ранее нами были получены продуценты 4 рекомбинантных лакказ *T. hirsuta* 072 в аскомиците *Penicillium canescens* PCA-10 (*niaD*⁻, мутант по нитратредуктазе) под контролем сильного промотора β-галактозидазы (*bgalS*). Ферменты были очищены и охарактеризованы, показано сходство рекомбинантного и нативного. Задачей данной работы стало получение продуцентов рекомбинантных изоферментов VP2, LiP9, MnP2, MnP5 и MnP7 *T. hirsuta*072 в аскомиците *P. canescens* PCA-10(*niaD*⁻) с целью последующего изучения их

свойств. Была разработана схема клонирования целевых генов. В результате ПЦР-фрагменты кодирующих областей ЛП без сигнальных пептидов были соединены с сигнальным пептидом гена *bgaS* под контролем промотора *bgaS*. Полученные плазмидные конструкции секвенированы, наработаны и введены в геном *P. canescens* PCA-10 (*niaD*). Трансформанты отобраны и проведена оценка активности секретируемых пероксидаз.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 22-74-00078).

МИКРОБНЫЕ КСИЛАНОЛИТИЧЕСКИЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КРАСНЫМИ ВОДОРΟΣЛЯМИ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ

Салова В.Д.¹, Холдина А.М.¹, Мельник А.Д.^{1,2}, Заюлина К.С.³, Ельченинов А.Г.³,
Клюкина А.А.³, Кубланов И.В.^{1,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт проблем нефти и газа РАН, Москва, Россия

³Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

salovavd@gmail.com

Ксилан – полисахарид, относящийся к гемицеллюлозам и входящий в состав клеточных стенок высших растений и водорослей. Он состоит из остатков β-D-ксилозы, соединенных 1→4 связями у высших растений или/и 1→3 связями у водорослей. Микроорганизмы, способные гидролизовать биополимеры, в том числе ксиланы, играют важную роль в деструкции органических веществ. Целью нашего исследования являлось изучение микробных сообществ, ассоциированных с красными водорослями и участвующих в разложении ксиланов в Белом море.

В качестве источников ксиланолитических микроорганизмов использовались образцы красных водорослей родов *Corallina*, *Phyllophora* и *Porphyra*, отобранных в акватории Кандалакшского залива Белого моря вблизи Беломорской Биологической Станции им. Н.А. Перцова. Культивирование проводили с добавлением букового ксилана или курдлана (β-1,3-глюкан) в качестве субстрата. Оценку таксономического разнообразия природных образцов и накопительных культур проводили с помощью секвенирования V4 региона гена 16S рРНК.

В результате филогенетического анализа были определены структуры микробных сообществ, ассоциированных с красными водорослями *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp. В микробиомах обеих водорослей доминировали филумы *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Кроме того, в микробном сообществе, ассоциированном с *Phyllophora* sp., в значительной степени были представлены филумы *Actinomycetota* и *Planctomycetota*. В образце из таллома *Corallina* sp. наибольшая доля микроорганизмов относилась к представителям родов *Vibrio*, *Agarivorans* и *Photobacterium*, а в образце из таллома *Phyllophora* sp. – *Granulosicoccus* и *Aliivibrio*. Во всех накопительных культурах также преобладали филумы *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*, однако доминировали представители родов бактерий, отличающихся от обнаруженных в природных образцах. Так, в накопительных культурах, инокулятом для которых являлись талломы *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана большую долю микробных

сообществ составили рода *Marinomonas* и *Polaribacter*, а в накопительной культуре, для которой инокулятом являлся таллом *Porphyra* sp., – *Marinomonas*, *Reinekea* и *Pseudoalteromonas*.

Идентифицированные в накопительных культурах бактерии родов *Polaribacter* и *Pseudoalteromonas* известны способностью к гидролизу природных полисахаридов, в частности ксилана. Рода *Marinomonas* и *Reinekea* можно отнести к группе диссипотрофов, использующих продукты гидролиза исследуемых полисахаридов. Несмотря на все различия между накопительными культурами, в результате анализа β -разнообразия они кластеризуются в одну группу, поэтому, можно предположить, что на исследуемых субстратах формируются ксиланолитические сообщества. Таким образом, в данной работе были исследованы микробиомы беломорских макроводорослей *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp., для которой структура микробного сообщества определена впервые, а также показано, что макроводоросли можно использовать в качестве источника микроорганизмов, продуцирующих психроактивные ксиланазы.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396).

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРОТИВ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Солоп Е.А., Худокормов А.А.

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

Elizabeth.solop@mail.ru

Работа с клеточными культурами стала неотъемлемой частью экспериментальной модели не только в современной биотехнологии, но и в биомедицинских исследованиях. Однако несмотря на высокую квалификацию исследователей и соблюдение всех требований при работе с клеточными линиями, часто возникает непреднамеренная бактериальная контаминация, которая может уничтожить ценную клеточную культуру. Для предотвращения загрязнения и сохранения клеточной линии многие исследователи добавляют антибактериальные вещества разной концентрации в питательную среду, но тогда повышается вероятность появления у бактерий резистентности к антибиотикам, что опасно для клеточных линий. В связи с этим целью данного исследования является подбор эффективной концентрации часто используемых антибиотиков для предотвращения бактериальной контаминации клеточных культур и исключения возможности появления резистентности к антибиотикам.

Исследование были проведены в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Для оценки работы антибактериальных веществ была смоделирована бактериальная контаминация. Эксперимент проходил в несколько этапов. На первом этапе культивировали в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$ человеческие дермальных фибробластов (использовалась линия DF-1, полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных ФГБУН Института цитологии РАН, 6 пассаж) в питательной среде DMEMна 25

чашках Петри. Через три дня проводили бактериальную контаминацию с помощью *Escherichia coli* K12 в концентрации 100 000 клеток на 100 мл. Затем ежедневно в течение 9 дней отслеживали характерные признаки контаминации с помощью микроскопии, а также визуальной оценки цвета и мутности среды. При первых признаках контаминации добавляли один из трех антибиотиков, таких как тилозин, гентамицин и пенициллин в разных концентрациях: 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 60 мкг/мл, 80 мкг/мл, 100 мкг/мл. В дальнейшем, оценивали антибактериальную эффективность добавленных веществ, а также выполняли микробиологический посев на мясопептонный агар (МПА), для определения колониеобразующих единиц.

Исследования показали, что при появлении характерных признаков бактериальной контаминации, таких как мутность и изменение pH среды на четвертые сутки, использование антибактериальных веществ в концентрациях 20 и 40 мкг/мл не дало видимого эффекта. Одинаковая визуальная реакция наблюдалась и после добавления тилозина 60 мкг/мл, а также гентамицина и пенициллина в концентрациях 80 мкг/мл. Через два дня после применения этих антибактериальных веществ, несмотря на визуальную эффективность препаратов, при бактериальном посеве на МПА, количество колониеобразующих единиц равнялось: при использовании тилозина в концентрации 60 мкг/мл – 20; при использовании 80 мкг/мл гентамицина – 50; при использовании 80 мкг/мл пенициллина – 77.

Результаты исследования показали, что наилучшей эффективностью обладают тилозин в дозировке 80 мкг/мл, гентамицин и пенициллин в концентрации 100 мкг/мл. Данные говорят о необходимости проведения дальнейшего исследования для выявления эффективной концентрации антибиотиков, чтобы преодолеть микробную резистентность.

ВЛИЯНИЕ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНОЛА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ *CANDIDA ALBICANS* И *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Степанов А.А., Васильченко А.С.

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии Х-БИО, Тюменский
государственный университет, Тюмень, Россия

stepanov590@mail.ru

Микозы, вызываемыми оппортунистическими грибковыми патогенами, в частности *C. albicans* и *A. fumigatus*, являются одной из ключевых проблем здравоохранения. Трудности в терапии грибковых инфекции связаны в том числе с формированием патогенами биопленок. Вместе с тем, возрастающая резистентность грибковых патогенов к конвенциональным антимикотикам делает поиск новых соединений актуальной задачей.

Особое внимание в свете борьбы с оппортунистическими инфекциями вызывают вторичные метаболиты бактерии рода *Pseudomonas*, в частности, 2,4-диацетилфлороглюцинол (2,4-ДАФГ). Данное соединение обладает широким спектром биологической активности, в том числе антифунгальной.

Целью данного исследования стало изучения влияния 2,4-ДАФГ на биопленкообразование *C. albicans* ATCC 10231 и *A. fumigatus* UTMN.

В качестве тест-штаммов использовали *C. albicans* ATCC 10231 и *A. fumigatus* UTMN. Изучено влияние 2,4-ДАФГ на биомассу и метаболическую био пленок исследуемых штаммов, а также состав экзополимерного матрикса био пленок. Кроме того, с помощью атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии проанализирована морфология био пленок, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ.

Показано, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 62-250 мкг/мл значительно ($p < 0.05$; 0,01) снижают как биомассу, так и метаболическую активность формирующихся био пленок *C. albicans*. В случае с био пленками *A. fumigatus* статистически значимое ($p < 0.05$; 0,01; 0,001) снижение биомассы и метаболической активности формирующихся био пленок наблюдалось при концентрациях 31-250 мкг/мл. При обработке 2,4-ДАФГ зрелых био пленок, наблюдалось снижение метаболической активности, но не биомассы. Кроме того, у био пленок *C. albicans* и *A. fumigatus*, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, было достоверно ($p < 0,01$; 0,001) снижено содержание белков и углеводов в экзополимерном матриксе.

Полученные результаты позволяют рассматривать 2,4-ДАФГ в качестве кандидата на роль нового антимикотика.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ FEWZ-2020-0006).

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ESCHERICHIA COLI* МЕТОДОМ ПЦР-РВ

Сульдина Е.В., Феоктистова Н.А., Ломакин А.А., Мاستиленко А.В., Богданов И.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,
Ульяновск, Россия

e.suldina2006@yandex.ru

При создании коллекции индикаторных культур и выделения бактерий рода *Escherichia* из объектов внешней среды и птицеводства в нашем исследовании установлено, что наиболее часто встречающимся патогенным этого рода у птиц является вид *Escherichia coli* (78%). Для разработки системы молекулярно-генетической идентификации был выбран регион *Escherichia coli* O157:H7 strain 7.1_Anguil plasmid pO157. Этот участок кодирует ehxA. Гемолизин ЕНЕС (ЕНЕС-HlyA, EhxA), токсин RTX, который специфически продуцируется штаммами ЕНЕС, примерно на 60% идентичен по аминокислотной последовательности α -гемолизину *E. coli*. Он обладает гемолитической и лейкотоксической активностью, но проявляет более сильную специфичность к клеткам-мишеням, чем α -гемолизин. На основании полученной последовательности ДНК указанного фрагмента были подобраны праймеры для проведения ПЦР.

После серии экспериментов был отработан и оптимизирован протокол для проведения ПЦР в режиме «реального времени» с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. В этом протоколе ПЦР использовали экстрагированную бактериальную ДНК штамма

Escherichia coli O157:H7 ATCC 23715 в качестве матрицы при следующих показателях цикла ПЦР: Предварительная денатурация – 95°C в течении 5 минут, 1 цикл 2. Денатурация – 95°C в течение 5 сек, Отжиг – 60°C в течении 15 сек, 30 циклов.

В результате подбора оптимальной концентрации праймеров было установлено, что она составляет 7 pM каждого праймера на реакцию.

Для подтверждения специфичности подобранной системы праймеров были использованы следующие штаммы бактерий: *Pasteurella multocida* D, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Bordetella avium* ATCC BAA -1003, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Salmonella infantis* 3, *Enterococcus faecalis* 517, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 23715, *Yersinia enterocolitica* OR 9. Специфичность разработанных праймеров составила 100%.

Для определения чувствительности разработанной системы, был подобран зонд GGAACAAAAGCTGCAGCGGG, в качестве флуоресцентного красителя использовали HEX, гасителя ВНQ-2. После синтеза зонда и серии экспериментов нами была подобрана его оптимальная концентрация равная 0,4 pM.

Были подобраны оптимальные показатели цикла для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с флуоресцентным зондом:

1. Предварительная денатурация – 95°C – 5 минут – 1 цикл
2. Денатурация – 95°C в течение 5 сек. Отжиг – 60°C в течение 15 сек – 50 циклов.

В результате проведенных исследований, установлено, что чувствительность праймерной системы и зонда составила 100 клеток.

Для проверки эффективности разработанной праймерной системы использовали 14 полевых штаммов бактерий, ранее идентифицированных нами по биологическим свойствам в бактериологических исследованиях как *Escherichia coli*. В качестве положительного контроля использовали референсный штамм *Escherichia coli* O157 H7 ATCC 23715. Подтверждено, что 13 из 14 полевых штаммов принадлежат виду *Escherichia coli*.

Исследование выполнено в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ по заданию МСХ РФ в 2022 году.

СОДЕРЖАНИЕ ЦИСТЕИНА У *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА

Сутормина Л.В., Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

lyubov-sutormina@mail.ru

L-цистеин является компонентом различных белков и глутатиона, служит источником восстановленной серы для многих органических молекул. Редокс-активные SH-группы цистеина способны восстанавливать внутриклеточные ионы Fe³⁺ до Fe²⁺, ускоряя реакцию Фентона с образованием токсичных OH⁻ радикалов. Клетки способны поддерживать гомеостаз и концентрацию свободного внутриклеточного цистеина на низком уровне.

Известно, что механизм действия бактерицидных антибиотиков основан на взаимодействии препарата со специфической мишенью в клетке. Ранее была выдвинута гипотеза, согласно которой механизм летальности бактерицидных антибиотиков связан с окислительным стрессом. Поэтому изучение гомеостаза цистеина как потенциального источника свободных радикалов может дать более полное представление о механизмах клеточной гибели при действии бактерицидных антибиотиков. Целью исследования было выяснение изменения содержания внутриклеточного (Cys_{in}) и экстраклеточного (Cys_{out}) цистеина при действии антибиотика ципрофлоксацина (ЦФ).

Ночную культуру родителя *Escherichia coli* BW25113 и лишённого глутатиона мутанта JW2663 ($\Delta gshA$) выращивали на минимальной среде M9 с 0.2% глюкозой в 250-мл колбах на шейкере (37°C, 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, затем вносили 3 мкг/мл ЦФ и инкубировали в течение 2 часов. Цистеин определяли по методу Gaitonde.

Содержание Cys_{in} у родителя в момент добавления ЦФ было 0.06 ± 0.002 , у *gshA* мутанта – $0.03 \pm 0.005 \mu M / OD_{600}$. Уровень Cys_{out} в родительском штамме в момент добавления ЦФ был 0.08 ± 0.02 , у мутанта *gshA* – $0.13 \pm 0.02 \mu M / OD_{600}$. В контрольных условиях через 2 часа культивирования содержание цистеина в среде повышалось в 3.4 и 2.8 раза у родителя и мутанта соответственно. Добавление ЦФ вызывало повышение уровня Cys_{in} в 2 раза у *gshA* мутанта и не влияло на концентрацию цистеина у родителя по сравнению с контролем. Также через 2 часа экспозиции антибиотика значения Cys_{out} достигали 0.71 ± 0.07 у родителя и $1.46 \pm 0.09 \mu M / OD_{600}$ у *gshA* мутанта. Таким образом, обработка *E. coli* ЦФ вызывает интенсивный выход цистеина из клеток, что может рассматриваться, как один из механизмов его гомеостаза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

ОПТИМИЗАЦИЯ МИНЕРАЛЬНОЙ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ НИТРИЛУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

Сыровацкая Г.А., Максимова Ю.Г.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН,
Пермь, Россия

gsyrovackya@gmail.com

Нитрилы – это органические соединения с группой $C \equiv N$. Они широко применяются в промышленности при синтезе полимеров, как растворители, интермедиаты фармацевтических препаратов, как самостоятельные лекарственные препараты.

Альтернативой химическому является ферментативный гидролиз нитрилов. Используя нитрилы как источник питания, бактерии способны разлагать их до соответствующих карбоновых кислот по нитрилазному, либо нитрилгидратазно-амидазному пути, с промежуточным продуктом амидом. Такие продуценты используются для производства биоакриламида, никотинамида, акрилата аммония.

При внедрении в производство возникает потребность проведения реакции в щелочной среде, в присутствии солей и растворителей. Таким образом, поиск высоко толерантных производственных штаммов из экстремальных сред всё более актуален для биотехнологии.

В действующем шламонакопителе АО «Березниковский содовый завод» из донных отложений с pH 11 и грунта старой карты содового шламохранилища с глубины 5 см выделены и идентифицированы штаммы *R. qingshengii* 5Э ИЭГМ1416 и *R. erythropolis* 6Э ИЭГМ 1417.

Цель работы заключалась в оптимизации среды культивирования *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э по источнику углерода и азота.

В минеральную среду, содержащую фосфаты и NaCl, сорбит или ацетамид (ACD) в качестве источника углерода, вносили 0,01 М NH₄Cl, (NH₂)₂CO, NaNO₂, NaNO₃, ацетонитрил (ACN) в качестве источников азота. *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э проявили максимальную нитрилгидратазную активность, равную 19,8 и 0,8 ммоль/г/ч соответственно, в среде с NaNO₂, ОП₅₄₀ до 0,7 на среде с ACN и NH₄Cl или NaNO₂ соответственно. Максимальная активность *R. qingshengii* 5Э достигала 25,4 ммоль/г/ч (ОП₅₄₀ 0,879) при 18,24 мМ ACN в среде, у *R. erythropolis* 6Э до 0,2 ммоль/г/ч (ОП₅₄₀ 0,850) при 9,12 мМ ACN.

Максимальная биомасса *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э была получена на сорбите и ACD как источниках углерода соответственно, причем оптимальное сочетание активности и биомассы *R. qingshengii* 5Э отмечено при 1,5% сорбита в среде (ОП₅₄₀ 0,659; 6,9 ммоль/г/ч) и *R. erythropolis* 6Э при 50 мМ ACD (0,587 ОП₅₄₀; 0,2 ммоль/г/ч).

Таким образом, для *R. qingshengii* 5Э оптимальными источниками углерода и азота являются 1,5% сорбит и 0,01 М NaNO₂/ACN, для *R. erythropolis* 6Э – 50 мМ ACD и 0,01 М NaNO₂.

ИЗМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА КИШЕЧНИКА КРЫС ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ТРЕХ ВЕЩЕСТВ, ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ КЛАССОВ ОКСОПРОИЗВОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ

Триандафилова Г.А., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов, филиал Пермского федерального
исследовательского центра Уральского отделения РАН, Пермь, Россия

lindick@ya.ru

Бактериальное сообщество кишечника человека вносит значительный вклад как течение естественных процессов в организме, так и в процессы, происходящие при развитии различных заболеваний. В норме бактерии обеспечивают пул витаминов B5, B12 и K, способствуют формированию иммунитета и влияют на функционирование слизистой кишечника. Изменение микробиомного состава сопровождается такими заболеваниями как сахарный диабет, атопический дерматит, аутоиммунный энцефаломиелит, колоректальный рак, ожирение печени, воспалительное заболевание кишечника. На бактериальный состав кишечника значительное влияние оказывают как диета, так и прием лекарственных препаратов. В связи с этим в процессе поиска и создания новых лекарственных веществ

актуальным является исследование не только общетоксического действия препарата, но и оценка его влияния на состав микробиома кишечника.

При исследовании представителей трех классов оксопроизводных азотсодержащих гетероцикловна бактериях *Escherichia coli* и лабораторных животных было выбрано три соединения с наибольшей биологической активностью. Два из них обладают бактериостатическим действием в отношении *E. coli*, а третье, не влияя на ростовые характеристики, достоверно снижает биопленкообразование.

В эксперименте по исследованию субхронической токсичности веществ были получены образцы кала крыс до и после двухнедельного введения *per os* двойной терапевтической дозы препаратов. Метагеномный состав определяли с помощью секвенирования ДНК на приборе MiSeq (Illumina, США).

Было установлено, что при действии всех трех веществ увеличивалась доля бактерий, относящихся к филуму *Firmicutes*, в основном за счет увеличения представителей класса *Bacilli*. Одно из бактериостатических веществ также вызывало увеличение количества бактерий, относящихся к типу *Vampirivibrionia*, филуму *Cyanobacteria*. Другое вещество, снижающее биопленкообразование *E. coli*, вызывало снижение количества представителей филума *Verrucomicrobiota* за счет бактерий, относящихся к классу *Verrucomicrobiae*.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-34-90016 и гос. заданием АААА-А19-119112290009-1.

ОЦЕНКА СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕРПЕНОИДОВ И АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тризна Е.Ю.¹, Колесникова А.И.¹, Гильфанов И.Р.¹, Никитина Л.Е.², Каюмов А.Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

trizna91@mail.ru

Быстрое развитие устойчивости к противомикробным препаратам у патогенных микроорганизмов вызывает необходимость поиска альтернативных способов борьбы с бактериальными инфекциями. Показано, что в некоторых случаях использование одного антимикробного препарата может способствовать повышению эффективности другого при терапии инфекций бактериальной и грибковой природы. Для некоторых терпенов, выделенных из природных масел, была показана противомикробная и противогрибковая активность, а также была выявлена способность действовать синергетически с некоторыми противомикробными препаратами.

Среди 53 протестированных терпеноидов только 1 вещество проявляло противомикробную активность в отношении *S. aureus* и подавляло рост бактерий при концентрации 16 мкг/мл, в то время как для остальных исследуемых веществ минимальная подавляющая концентрации превышала 256 мкг/мл. Однако при оценке сочетанного действия терпеноидов с амикацином было показано, что 11 соединений способны повышать эффективность антибиотика и действовать синергетически. Установлено, что индекс

фракционной ингибирующей концентрации (иФИК) амикацина в присутствии этих веществ варьировал в диапазоне 0.094–0.375. Комплексное использование 7 терпеноидов с цефтриаксоном также приводило к повышению эффективности последнего, хоть и эффект был менее выражен и иФИК составил 0.251–0.502. Среди 53 терпеноидов 5 повышали эффективность ципрофлоксацина. При этом ни одно из соединений не повышало эффективность мирамистина в отношении золотистого стафилококка.

Таким образом, совместное использование терпеноидов с различными противомикробными препаратами в отношении золотистого стафилококка способно повысить эффективность антибиотиков, что может служить основой для нового подхода в противомикробной терапии.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОЙ N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ RIML БАКТЕРИИ *THERMUS THERMOPHILUS*

**Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Быков В.В., Кудряшов Т.А., Соколов А.С.,
Вологжанникова А.А., Шевелева М.П., Лаптева Ю.С.**

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

masha.trunilina@mail.ru

N-концевое ацетилирование (Nt-Ac) является одной из наиболее распространенных и хорошо изученных модификаций эукариотических белков (до 90% белков ацетируется). Nt-Ac важно для правильного сворачивания белков и пептидов, формирования белок-белковых взаимодействий, а также для корректной работы многих белков и ферментов. Nt-Ac катализируют специфические ферменты – N-концевые ацетилтрансферазы (NAT). В клетках бактерий и архей Nt-Ac открыто сравнительно недавно и затрагивает от 13 до 28% протеома. Показано, что NAT бактерий ацетируют антибиотики, полиамины, ряд клеточных белков и ферментов, изменяя тем самым их активность, а также токсические производные метионина – метионин сульфоксимин и метионин сульфон, уменьшая их токсичность для клеток бактерий и корней растений.

На данный момент наиболее изученными NAT бактерий являются RimL, RimI, RimJ и YiaC. Известно, что RimL из бактерий *E. coli* и *S. enterica* ацетируют рибосомальный белок L12, активны в отношении белков с N-концевым Ser или Ala. RimL ацетирует микроцин C, превращая его в нетоксичное соединение, а также придает клеткам устойчивость к альбомуцину. RimL *E. coli* используется для Nt-Ac рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии.

Ввиду низкой термостабильности и ограниченной субстратной специфичности RimL *E. coli* актуальным является поиск гомологичных ферментов из экстремофильных организмов.

В этой связи цель данной работы заключается в изучении свойств N-ацетилтрансферазы RimL из *T. thermophilus*. В настоящее время установлена трехмерная структура данного фермента, однако отсутствуют данные о его специфичности и физико-химических свойствах.

Ген TTHA1799, кодирующий предполагаемую N-ацетилтрансферазу RimL (UniProtID: Q5SHD1), бактерии *T. thermophilus* (VKM В-1605) клонирован в вектор рЕТ-29. Белок наработан в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищен до гомогенного состояния. Современными методами физической химии исследованы свойства RimL. Методом динамического светорассеяния установлено, что RimL является ди-/гексамером. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что RimL является термостабильным белком, с серединой теплового перехода $87^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Методом собственной флуоресценции показано, что фермент устойчив к действию гуанидингидрохлорида до 2.2 молярной концентрации.

Фермент RimL бактерии *T. thermophilus* может быть востребован в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов при повышенных температурах и в присутствии денатурирующих веществ.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00478.

ПОИСК ГОМОЛОГОВ ГЕНОВ ПЭТ-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В ГЕНОМАХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ И ИХ ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ

Трушин В.О.¹, Заюлина К.С.², Карасева А.И.²,
Ельченинов А.Г.², Бонч-Осмоловская Е.А.^{1,2}

¹Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

daucuzs@gmail.com

В настоящее время накопление пластиковых отходов является одной из серьёзных проблем для окружающей среды. Одним из пяти наиболее используемых пластиков является полиэтилентерефталат (ПЭТ). Имеющиеся методы его переработки не универсальны и требуют использования токсичных соединений, высоких температур и давления, поэтому имеется запрос на поиск путей биодegradации ПЭТ, не требующих жёстких условий и селективных в отношении разлагаемого материала. Однако, подходящих для этого ферментов найдено и охарактеризовано всё ещё довольно мало (например, белки из протеобактерии *Idionella sakaiensis*, актиномицетов родов *Thermobifida* и *Saccharomonospora*, гриба *Humicola insolens* и метагенома листового компоста), и каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, в силу чего поиск новых ферментов из термофилов, способных к гидролизу ПЭТа, до сих пор остаётся актуальным.

Целью настоящей работы является поиск генов, кодирующих новые ПЭТ-разлагающие ферменты, в геномах термофильных прокариот, их гетерологичная экспрессия и оценка возможности кодируемых ферментов разлагать ПЭТ.

Поиск целевых ферментов осуществлялся в *in silico* транслированных геномах *Tepidisphaera mucosa*, *Tepidiforma bonchosmolovskaya*, *Infirmifulum lucidum*, *Fontivita pretiosa*,

“*Fontisphaera persica*”, *Melirobacter roseus*, *Thermogutta terrifontis*, *Thuera sp.*, *Tautonia sociabilis*, *Arenimonas fontis*, *Thermogemmata fonticola*, “*Stygiobacter electus*” с помощью BLAST (порог e-value = 10^{-5}) с использованием последовательностей известных ПЭТаз в качестве запроса. Далее отбирали последовательности, имеющие каталитические домены, характерные для ПЭТ-разлагающих ферментов, используя базу данных Pfam. Отобранные гены были амплифицированы и клонированы в векторы pLATE31 или pLATE51 с помощью набора безлигазного клонирования aLICator. С помощью бело-голубой селекции были получены клоны *Escherichia coli* XL1-Blue, несущие целевые плазмиды. Корректность вставки в плаزمиды была подтверждена секвенированием, после чего экспрессионный штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) был трансформирован этими плазмидами. Штаммы наращивали в жидкой среде и индуцировали экспрессию белка с помощью ИПТГ, после чего собирали биомассу, разрушали клетки сонификацией и очищали целевые белки с помощью Ni-аффинной хроматографии. Наличие целевых белков визуализировали с помощью денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

В результате были найдены 16 генов-гомологов ПЭТ-гидролизующих ферментов (*Tb0067*, *Tb0284*, *Tb9298* из *Tepidiforma bonchosmolovskaya*; *Ts694*, *Ts920*, *Ts4088* из *Tautonia sociabilis*; *Tm9045*, *Tm1218*, *Tm1408* из *Tepidisphaera mucosa*; *Tt2719*, *Tt3304* из *Thermogutta terrifontis*; *Se1063*, *Se2228* из *Stygiobacter electus*; *Tp1129* из *Thuera sp.*; *Af2123* из *Arenimonas fontis*; *Mr0875* из *Melirobacter roseus*). Белки, кодируемые генами *Tb9298*, *Tm9045* и *Tt2719*, были частично очищены. В дальнейшем планируется проверить способность выделенных белков к гидролизу ПЭТа.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396).

ПРОДУКЦИЯ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ АЭРОБНОМ РОСТЕ НА БОГАТЫХ СРЕДАХ

Тюленев А.В.¹, Габова А.О.^{1,2}, Смирнова Г.В.¹, Октябрьский О.Н.¹

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

²Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Leksey333@yandex.ru

Изучение продукции сульфида клетками бактерий в настоящее время вызывает большой интерес исследователей, поскольку этот процесс играет важную роль в поддержании гомеостаза цистеина.

Объектом исследований служили родительский штамм *E. coli* BW25113 (wt) и делеционные мутанты из коллекции Keio, которые культивировали на среде LB в колбах на термостатируемом шейкере (37°C, 150 об/мин) Продукцию сульфида контролировали непосредственно в колбах с помощью системы сульфид-специфичного халькогенидного электрода XC-S2-001 («Сенсорные системы», Россия) и цифрового иономера сpX-2 (ИБП Пушино, Россия) в режиме реального времени.

Показано, что культуры *E. coli*, растущие аэробно на среде LB, продуцировали сульфид без внешних воздействий, что могло быть вызвано присутствием цистеина в составе питательной среды. Родительский штамм BW25113 начинал активно продуцировать сульфид к концу аэробной фазы роста. Был проведен скрининг мутантов *E. coli*, дефектных по генам, ответственным за синтез, транспорт и деструкцию цистеина, потенциально участвующих в поддержании его гомеостаза. В растущих культурах штаммы JW2407 (*cysK*), JW2975 (*metC*), JW3686 (*tnaA*) начинали образовывать сульфид сразу после инокуляции бактерий и поддерживали его продукцию в течение всего эксперимента. Мутанты по транспортерам цистеина JW5250 (*eamA*), JW2562 (*eamB*), JW5363 (*bcr*) и AN2343 (*cydD*) с высокой интенсивностью продуцировали сульфид сразу после инокуляции в течение 60 мин. Отсутствие выделения сульфида в аэробных условиях было отмечено у штаммов JW2505 (*mstA*), JW1267 (*cysB*) и JW1718 (*tsyP*). Максимальная продукция H₂S наблюдалась у мутанта *gshA*, дефектного по синтезу глутатиона.

Таким образом, большинство испытываемых мутантов по ферментам деградации, транспорту цистеина и регуляции Cys-оперона в той или иной степени влияли на интенсивность и кинетику продукции эндогенного сульфида. Требуются дальнейшие исследования для более полного понимания роли продукции сульфида в поддержании гомеостаза цистеина.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00093.

ВЛИЯНИЕ ОБРАЗА ЖИЗНИ И ВОЗРАСТА НА МЕТАГЕНОМЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ МЫШЕЙ

Федорова М.О.¹, Запорожченко Н.С.¹, Бобровский Д.М.², Тутукина М.Н.³

¹ГБОУ Школа им. маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия

²École Polytechnique fédérale de Lausanne, Лозанна, Швейцария

³Сколтех, Россия

mofedorova@mail.ru

Мыши являются классическим модельным организмом, на них проводятся многие физиологические и биохимические эксперименты. При этом на результаты экспериментов могут влиять многие факторы – как индивидуальные особенности животных, так и системные особенности их содержания. Так, например, на процессы в организме может оказывать влияние микробиом. Метагеномный подход к изучению микробиомов обеспечивает подробные количественные измерения таксономического состава при помощи секвенирования, не требуя при этом культивирования бактерий. Цель работы: сравнение метагеномов ротовой полости мышей, живущих в разных условиях, оценке количества и разнообразия живущих бактерий и возможность их влияния на результаты экспериментов. Предполагалось, что чем стерильнее условия проживания мышей, тем менее разнообразен состав их микробиома.

Образцы были собраны из ротовой полости мышей стерильными ватными тампонами, для исключения размножения бактерий во время хранения помещены в пробирку с буферным раствором. С помощью набора PureLink Microbiome DNA Purification Kit была выделена ДНК. Затем амплифицирован переменный участок V4-V5 16S рРНК с использованием прямого праймера 515F и обратного праймера 907R. Во избежание стадии лигирования адаптеров Illumina, были взяты праймеры с уже добавленными адаптерами: Adaptor 1 к праймеру 515F; Adaptor 2 к праймеру 907R. Для проверки эффективности ПЦР и качества ампликонов был проведен электрофорез в 2% агарозном геле. После была заново проведена ПЦР, ампликоны очищены с помощью магнитных шариков Ampure XP и использованы для приготовления библиотек. Образцы были секвенированы на платформе Illumina MiSeq, в режиме 250+250 PE в ЦКП Геномики Сколтеха. Полученные данные были обработаны с помощью кода на языке Python. Для оценки разнообразия данные визуализированы с помощью Qiime 2.

Было выделено 4 группы мышей: домашние, вивариумные, одомашненные и лабораторные. Среди всех групп наименьшим разнообразием обладают мыши больные эпилепсией. Также с возрастом можно наблюдать рост количества бактерий *Neisseria*, представители которых часто бывают патогенными. У мышей, живших сначала в лаборатории, а потом в домашних условиях имеется около 40% *Burkholderia*— это устойчивые к антибиотикам патогенные бактерии. Вероятно, при переселении из стерильных условий иммунитет мыши был не способен противостоять бактериям, что привело к их активному размножению. *Bacteroidales* (типичные представители микробиоты кишечника человека, вовлечены в процесс сбраживания углеводов, утилизации белков и биотрансформации желчных кислот) в большом количестве представлены у домашних мышей, которые имели непосредственный контакт с человеком. В дальнейшем планируется обработать результаты секвенирования оставшихся образцов, получив большую выборку результатов анализа состава микробиома.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ГИДРОГЕЛЯ С ДОБАВЛЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ КОНСЕРВАНТОВ

Фоменко А.А.^{1,2}, Карасева Э.В.¹, Мелконян К.И.²

¹ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ,
Краснодар, Россия

fomenkooa@ksma.ru

Для лечения трофических язв, ожогов, ран зачастую используют гидрогели на основе животного или растительного сырья, относящиеся к группе нестерильных лекарственных средств (НЛС). Такие НЛС могут быть контаминированы микроорганизмами на различных стадиях производства. Использование зараженных препаратов может усугубить степень повреждения и привести к инфицированию раны. В таком случае могут быть назначены антибиотикосодержащие препараты, зачастую приводящие к приобретению микроорганизмами резистентности. Для решения этой проблемы ведется поиск

антибактериальных вспомогательных веществ – консервантов и их сочетаний, которые будут оказывать эффективное противомикробное действие и не будут вызывать сенсibilизации кожи.

С учетом предельно допустимых концентраций были подобраны консерванты и сочетания консервантов: сорбат калия (0,5%, 0,4%, 0,25%), бензоат натрия (0,25%, 0,2%, 0,1%), метилпарабен (0,4%, 0,3%, 0,2%), пропилпарабен (0,4%, 0,3%, 0,2%), сорбат калия и пропилпарабен (0,8%), бензоат натрия и пропилпарабен (0,8%), бензоат натрия и метилпарабен (0,5%), сорбат калия и метилпарабен (0,5%).

Исследование проводилось с использованием образцов гидрогеля, полученного путем гелирования 5% раствором NaOH дермы свиньи породы Ландрас, с добавлением растительного экстракта, содержащего производные флаван-3-олов и олигомерных проантоцианидинов, полученного методом вакуумно-фильтрационного экстрагирования.

Все испытания проводились согласно XIV изданию Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота». Для оценки эффективности смесей консервантов использовали полуколичественный учет колоний бактерий и грибов, выросших на мясо-пептонном агаре (МПА), а также посев образцов на селективные и дифференциально-диагностические среды: питательная среда №14 ГРМ, питательная среда №10 ГРМ, ЭНДО-агар, трехсахарный агар с солями железа, цетилпиридиний хлорид агар, соево-казеиновый агар и агар Сабуро.

Микробиологическое исследование моноконсервантов показало их низкую антибактериальную активность. В ходе культивирования образцов на питательной среде МПА было установлено, что смесь сорбата калия и пропилпарабена в максимальной концентрации 0,8% ингибировали рост микроорганизмов. Наименьшую антибактериальную активность проявили: смесь бензоата натрия и метилпарабена в концентрации 0,5% и смесь сорбата калия и метилпарабена в концентрации 0,8%, посев на плотные питательные среды показал наличие обильного бактериального роста. На дифференциальной среде ЭНДО-агар отмечен рост колоний грамотрицательных палочек, относящихся к роду *Enterobacteriaceae*. На питательной среде №10 ГРМ был отмечен рост колоний грамположительных кокков, которые при микроскопировании визуализировались в виде виноградных гроздьев, что свидетельствует о принадлежности данных бактерий к виду *S. aureus*. На селективной среде Сабуро был отмечен рост грибных колоний *Candida albicans*. При посеве образцов с добавлением бензоата натрия и пропилпарабена на МПА был отмечен умеренный рост колоний микроорганизмов, относящихся к родам *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, а также грибов рода *Candida*.

Таким образом, наиболее эффективной композицией консервантов для сохранения микробиологической чистоты НЛС в виде гидрогеля является смесь сорбата калия и пропилпарабена в концентрации 0,8%.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *GORDONIA RUBRIPERTINCTA* 112 – ДЕСТРУКТОРА АРОМАТИЧЕСКИХ И АЛИФАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Французова Е.Э.¹, Ветрова А.А.¹, Богун А.Г.^{1,2}, Делеган Я.А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

frantsuzova.ee@gmail.com

Штамм 112 был ранее идентифицирован путём анализа гена 16S рРНК как предположительно принадлежащий к виду *Gordonia rubripertincta*. Для более достоверной идентификации рассчитаны параметры ANI и DDH между геномами штамма 112 и типового штамма *G. rubripertincta* ATCC14352, а также выполнено сравнение генома штамма 112 с другими штаммами *G. rubripertincta* из базы данных Genbank. Выявлено, что ближайшим родственником штамма 112 является типовой штамм *Gordonia rubripertincta* ATCC14352.

Выполнен анализ пангенома штамма 112 и его ближайших родственников *G. rubripertincta* ATCC14352, *G. rubripertincta* CWB2 и *G. rubripertincta* W3S5. Пангеном штаммов представлен 4758 генами, из которых всего 3669 генов (77.11%) составляют кор. Полученный результат может свидетельствовать о гетерогенности вида *G. rubripertincta*. Помимо этого, изучен пангеном штаммов *Gordonia* других видов из коллекции лаборатории физиологии микроорганизмов. Пангеном штаммов 4 разных видов *Gordonia* (*alkanivorans*, *amicalis*, *polyisoprenivorans* и *rubripertincta*) составляет 4586 генов, из которых 2885 (62.90%) приходятся на кор. Среди проанализированных *Gordonia* разных видов штамму *G. rubripertincta* 112 наиболее родственен штамм *G. alkanivorans* 135 – пара имеет 169 генов, уникальных для данной пары и не встречающихся у других проанализированных штаммов.

Выполнена функциональная аннотация генов штамма 112, а также геномов других *G. rubripertincta* из базы данных Genbank, чтобы сравнить представленность интересующих метаболических путей в геномах штаммов вида. В базе данных KEGG в категории «Деградация и метаболизм ксенобиотиков» у штамма 112 обнаружено 77 генов. Наиболее многочисленными в категории являются функциональные кластеры дегградации бензоата, ксилолов и стероидов. Найдены гены деструкции катехола как по орто-, так и по мета-пути. Способность штамма 112 к росту на бензоате и катехоле в качестве единственного источника углерода и энергии была экспериментально подтверждена. Выявлено, что штамм 112 способен утилизировать алканы с длиной цепи C₁₀-C₁₆. Штамм способен к росту на декане (C₁₀) не только в парах, но и при прямом контакте микроорганизма с субстратом. Анализ аннотированного генома показал отсутствие у штамма 112 генов *alkB*, следовательно, способность к деструкции алканов, вероятнее всего, контролируется генами CYP153. При анализе остальных геномов *G. rubripertincta* из базы данных Genbank, геномы которых полностью секвенированы, также не выявлено оперона *alkB*. Это позволяет предположить, что отсутствие генов *alkB* может быть видовой особенностью.

Работа поддержана грантом РФ №22-74-10082.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТА HOK/SOK ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ УРОВНЯ БИОСИНТЕЗА
АСПАРАГИНАЗЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛАЗМИДЫ pET28E В ШТАММЕ
E. COLI BL21

Хасанов Д.С., Шайфутдинов Р.Р., Орлова Н.А., Воробьев И.И.

Лаборатория биоинженерии клеток млекопитающих – подразделение
ФИЦ биотехнологии РАН, Москва, Россия

ooovizorooo@gmail.com

Одним из распространенных вариантов системы сегрегационной стабилизации является структура токсин-антитоксин. Системы токсин-антитоксин первого типа включают в себя генетический элемент hok/sok, выделенный из природной плазмиды *E. coli* R1. В элементе hok/sok ген hok кодирует долгоживущий токсичный полипептид, а sok является короткоживущей антисмысловой РНК, блокирующей трансляцию гена hok [1].

Мы предположили, что действие hok/sok и его токсический эффект в отношении клеток-хозяев может различаться в зависимости от положения и ориентации элемента.

Эта гипотеза была исследована для штамма *E. coli* BL21[DE3], векторной плазмиды pET28a с геном устойчивости к канамицину, а также малотоксичного для *E. coli* гена аспарагиназы [2].

Были получены три варианта плазмид с элементом hok/sok – расположенном после терминатора транскрипции целевого гена, рамка считывания Hок на плюс-цепи (HD), в той же позиции, но на минус-цепи (HR), а также перед промотором целевого гена; Hок на минус-цепи (HU).

Для проверки сегрегационной стабильности полученных плазмид использовали периодическое культивирование штаммов в жидкой среде без антибиотика в присутствии индуктора – 1 мМ IPTG. Все три варианта плазмиды с элементом hok/sok сохранялись у более чем 75% клеток после трех дней культивации, т.е. шести пересевов, а контрольная плаزمид без элемента hok/sok – у менее чем 1% клеток.

При измерении содержания аспарагиназы в клетках, установлено, что оно составляет после первого дня pET28a – 1,3 мг/л, HD – 43,5 мг/л, HDR – 22,75 мг/л, HU – 9 мг/л, но изменяется, и существенно снижается для HD и HDR после третьего дня – для pET28a 1,75 мг/л, HD – 7,5 мг/л, HDR – 11 мг/л, HU – 14 мг/л.

Мы предположили, что такое падение уровня целевого белка при сохранении клетками плазмиды может быть следствием мутаций в клетках. Для трех канамицин-устойчивых колоний с плазмидой HD, высеянных на твердую среду после третьего дня культивации, было обнаружено, что выделенные из них плазмиды после трансформации в клетки BL21[DE3] кодируют ферментативно активную аспарагиназу и скорость ее накопления соответствует исходной.

В результате, было установлено, что наибольшей стабильностью и продуктивностью обладают HD и HDR; HU обладает меньшей продуктивностью, а pET28 выпадает из клеток быстрее всего. Таким образом, позиция, но не ориентация, элемента hok/sok в плазмиде влияет на уровень биосинтеза целевого белка при культивации без антибиотика

Литература.

1. (RU2496877C2) Плазмидный вектор рНУР с повышенной сегрегационной стабильностью для экспрессии рекомбинантного белка – Орлова Н.А., Воробьев И.И.
2. The parB (hok/sok) Locus of Plasmid R1: A General Purpose Plasmid Stabilization System. Nature Biotechnology 6, 1402 – 1405 (1988)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РОСТ ШТАММА *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* ВКМ В-3655

Шайкин А.А.^{1,2}, Абашина Т.Н.¹, Вайнштейн М.Б.¹

¹«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушино, Россия

²Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

shaikin.artem@gmail.com

Автотрофные ацидофильные бактерии вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* являются классическими организмами для биовыщелачивания металлов из сульфидных руд, отвалов и концентратов. Минеральное сырье часто содержит тяжелые металлы, которые подавляют рост и жизнедеятельность выщелачивающих бактерий. Целью нашей работы было изучение влияния повышенных концентраций растворенных тяжелых металлов Ni, Cu, As на рост ацидофильного автотрофного штамма *Acidithiobacillus ferrooxidans* ВКМ В-3655. В нашей работе было изучено влияние устойчивости к концентрациям солей токсичных металлов от 0,5 % до 2 %.

Штамм *A. ferrooxidans* ВКМ В-3655 выращивали в среде Сильвермана и Люндгрена 9К. В качестве источников тяжелых металлов использовали сульфат никеля (II), сульфат меди (II) и какодилую кислоту. Какодилевая кислота была использована как органическое соединение мышьяка, так как неорганическая мышьяковая кислота реагирует с солями железа в среде (источником энергии для *Acidithiobacillus ferrooxidans*) и выпадает в осадок. Среду с содержаниями солей металлов 0; 0,5; 1,0; 1,5; и 2,0% засеивали активной культурой. Культивирование проводили при 28°C на качалке (ИБФМ РАН, Россия) при 180 об./мин. Контроль роста биомассы проводили учетом содержания белка по методу Брэдфорд. Прирост или убыль белка оценивали в динамике в одних и тех же пробирках по сравнению с изначальным содержанием.

Наши исследования показали, что штамм *Acidithiobacillus ferrooxidans* ВКМ-3655 устойчив к следующим концентрациям солей тяжелых металлов: медь до 2% (прирост на 10-11%), никель до 2% (прирост на 3%, при концентрации), мышьяк до 2% (прирост на 5%).

Таким образом, экспериментальная проверка показала, что штамм *A. ferrooxidans* ВКМ В-3655 может быть успешно использован для выщелачивания минерального сырья с содержанием меди до 0,8%, никеля до 0,6% и мышьяка до 1%.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00380, <https://rscf.ru/project/23-24-00380/>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА-НОСИТЕЛЯ ДЛЯ МЕТАНОГЕННОГО
РЕАКТОРА ПРИ ДВУХСТАДИЙНОМ ПОЛУЧЕНИИ БИОГИТАНА ИЗ МОЛОЧНОЙ
СЫВОРОТКИ НА ОСНОВАНИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Шехурдина С.В.^{1,2}, Журавлева Е.А.², Лайкова А.А.², Михеева Э.Р.¹,
Катраева И.В.¹, Литти Ю.В.²

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва, Россия

sh.sweeta99@gmail.com

Переработка органических отходов в процессе двухстадийного анаэробного сбраживания (АС) является перспективной и экологически чистой технологией, позволяющей получать не только биогаз, но и биоудобрение. Разделение кислотогенной и метаногенной стадий обеспечивает раздельное получение H_2 и CH_4 , смешение которых в определенном соотношении дает высокоэнергетическую смесь – биогитан. Добавление различных материалов-носителей способствует биопленкообразованию, а использование электропроводящих и некоторых инертных материалов стимулирует прямой межвидовой перенос электронов (DIET), что также улучшает стабильность и эффективность процесса АС.

Целью работы было определение оптимального материала-носителя для метаногенного реактора при двухстадийном получении биогитана из молочной сыворотки на основании биотехнологических и микробиологических характеристик. В качестве материалов-носителей использовались инертные полиуретановая пена (R1) и фарфор (R3), электропроводящий угольный войлок (R2), и смесь угольного войлока и фарфора (R4). Гидравлическое время удержания (HRT) составило 1,5 дня для метаногенных реакторов. В кислотогенном реакторе (RH) с HRT равным 10 часам, в качестве материала-носителя использовалась полиуретановая пена. Содержание H_2 в биогазе в RH составило 26%. Самое высокое содержание CH_4 в биогазе было отмечено в R2 (64%) и R4 (72,3%), а в R3 происходило закисление (1,4% метана). Самое низкое содержание летучих жирных кислот наблюдалось в R2 и R4. Основу бактериального сообщества планктонных и прикрепленных форм RH составляли рода *Streptococcus*, *Thermoanaerobacterium*, *Veillonellales-Selenomonadales* и *Pseudomonas*, в значительной степени присутствовал род *Lactobacillus*. Представители рода *Thermoanaerobacterium* являются H_2 -продуцирующими микроорганизмами. Одновременное присутствие представителей рода *Streptococcus*, класса *Veillonellales-Selenomonadales* и *Lactobacillus* может способствовать повышению выхода H_2 за счет их синергетического действия. Основу архейного сообщества для планктонных и прикрепленных форм в R1-R4 составляли гидрогенотрофные метаногены рода *Methanothermobacter*. Планктонное микробное сообщество R1-R4 было представлено кислотообразующими бродильными микроорганизмами родов *Streptococcus*, *Thermoanaerobacterium*, *Pseudomonas* и *Veillonellales-Selenomonadales*, присутствовали синтрофные ацетат-окисляющие бактерии рода *Proteiniphilum*. Имобилизованное микробное сообщество реакторов (не считая R3) было представлено в основном синтрофными группами класса *Aminicenantales*, семейства *Spirochaetaceae*, родов *Anaerolinea*, *Pelotomaculum*, *Coprothermobacter* и группы *Cloacimonadaceae* W5. Для R3 не наблюдалось активного развития синтрофного сообщества,

в основном преобладали бродильные и H₂-продуцирующие микроорганизмы. В реакторе, содержащем смесь угольного войлока и фарфора (R4) синтрофное сообщество было более разнообразным и отмечалось самое высокое содержание метана в биогазе, что делает смесь инертного фарфора и электропроводящего угольного войлока оптимальным материалом-носителем для двухстадийной анаэробной переработки молочной сыворотки в биогитан.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-79-10153.

БЕЛКОВЫЕ МИШЕНИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *Mycolicibacterium smegmatis*, ЭФФЕКТ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Шашин Д.М., Демина Г.Р., Вострокнутова Г.Н., Капрельянц А.С., Шлеева М.О.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

dmshashin@gmail.com

Возбудитель туберкулёза – *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) способен образовывать покоящиеся формы, в которых он устойчив к воздействию стрессовых факторов иммунной системы хозяина и антибиотиков. Этот факт, а также распространение антибиотико-резистентных штаммов возбудителя обуславливают необходимость поиска новых методов терапии заболевания, одним из которых может стать фотодинамическая терапия. В данной работе, на примере *Mycolicibacterium smegmatis* – быстрорастущего непатогенного родственника *Mtb* мы рассматриваем влияние ионов металлов в среде роста на индукцию накопления фотоактивных молекул порфиринов в микобактериях, а также эффект аскорбиновой кислоты (АК), тушителя синглетного кислорода, на жизнеспособность бактерий после облучения. Целью работы являлось выявление первичных белковых мишеней покоящихся форм микобактерий, которые повреждаются в результате светового воздействия, а также оценка влияния ионов металлов и аскорбиновой кислоты на эффективность фотоинактивации. *M. smegmatis*.

Покоящиеся клетки *M. smegmatis* получали при постепенном закислении среды роста в стационарной фазе в течение 16 сут при разных концентрациях цинка и магния в среде. Клетки подвергали воздействию света с длиной волны 565 нм (совпадает с одной из полос в спектре поглощения порфиринов в видимой области) в течение 60 мин (плотность мощности 180 мВ/см²). Экстракцию накопленных порфиринов проводили последовательно с помощью системы растворителей хлороформ-метанол-вода и затем PBS-Triton. Определение концентрации пигментов в экстрактах и культуральной жидкости проводили при помощи спектрофотометрии. Количество жизнеспособных клеток после облучения определяли с помощью метода последовательных разведений. Белки облучённых микобактерий разделяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12% ПААГ в присутствии SDS.

Продемонстрировано, что в присутствии 25 мМ магния и 3,1 мкМ цинка наблюдается значительное увеличение общего количества эндогенных порфиринов в клетках *M. smegmatis*, что коррелирует с возрастанием фоточувствительности этих бактерий. LC-MS анализ состава порфиринов, изменяющихся в присутствии повышенных концентраций цинка и магния выявил, что наряду со стандартным набором, характерным для покоящихся форм *M. smegmatis*

появляется дополнительный пик, с временем выхода 18 минут и имеющий значение m/z 785. С другой стороны, в присутствии АК в среде было выявлено 10-кратное увеличение числа КОЕ бактерий после облучения, по сравнению с контролем. На ПААГ после электрофореза белков, выделенных из бактерий после светового воздействия, обнаруживаются многочисленные белковые агрегаты, по сравнению с контрольными вариантами. Предположительно, происходит образование межмолекулярных сшивок различных белковых молекул, что нарушает функциональность данных белков. В качестве возможных мембранно-связанных мишеней были протестированы ферменты дыхательной цепи и дыхательная цепь в целом. Было выявлено, что после 30 мин освещения метаболически активных клеток *M. smegmatis*, выращенных в среде Сотона присутствии 3 мМ аминокислоты резко снижалась активность дыхательной цепи, а также активность ДФИ-редуктазы. Высокая чувствительность ферментов дыхательной цепи к действию света указывает, что именно они могут быть первичными мишенями при фотодинамическом эффекте при длине волны 565 нм.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00324.

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИМЕДИЦИНА

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ПИРИДОКСИНА – АКТИВАТОРА Nrf2-ЗАВИСИМОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

Амозова В.И.¹, Балакина А.А.^{1,2}, Приходченко Т.Р.¹, Ступина Т.С.¹, Мищенко Д.В.^{1,2,3}

¹ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Научно-образовательный центр государственного университета просвещения
в г. Черноголовка, Мытищи, Россия

amozovavi@gmail.com

Основным побочным эффектом химиотерапии злокачественных новообразований с применением доксорубина принято считать специфическую кардиотоксичность, приводящую к тяжелому течению заболевания и повышению смертности у онкологических больных. Фактор транскрипции Nrf2 – ключевой белок-регулятор антиоксидантного ответа на окислительный стресс в клетках. Nrf2 является перспективной мишенью для потенциальных лекарственных средств с протекторными свойствами. Синтезированное нами соединение – новое производное пиридоксина, обладающее антиоксидантной и NO-донирующей активностью, было исследовано как потенциальный кардиопротектор при химиотерапии доксорубином.

В исследовании использовали ди(3-гидрокси-4,5-бис(гидроксиметил)-2-метилпиридиний) (В6NO) и доксорубина гидрохлорид (ДОКС, Pharmachemie B.V., Нидерланды). Эксперименты проводили *in vitro* на моделях нормальных (FetMSC) и опухолевых (HerG2) клеток и *in vivo* на модели лабораторных мышей BDF₁. Изучение экспрессии белков в клетках и тканях сердца проводили с помощью методов иммунофлуоресцентной микроскопии, иммуноблоттинга и ИФА. Изменение экспрессии генов изучали с применением метода Real-time PCR. Клеточный цикл исследовали с помощью проточной цитофлуориметрии.

В экспериментах *in vitro* было показано, что в результате воздействия В6NO на нормальные клетки происходит активация Nrf2-зависимого антиоксидантного пути, сопровождающееся снижением окислительных процессов, индуцированных ДОКС. Совместное действие В6NO и ДОКС на опухолевые клетки приводит к значительному усилению цитотоксического эффекта, изменению профиля клеточного цикла и активации каспаз. Исследование действия В6NO *in vivo* показало, что соединение вызывает накопление Nrf2 в тканях сердца, а также повышение экспрессии генов и белков антиоксидантной системы. Кроме того, антиоксидант в комбинации с ДОКС по сравнению с действием только ДОКС снижал концентрацию малонового диальдегида, повышал уровень восстановленного глутатиона в тканях сердца и нормализовал биохимические показатели крови.

Было показано, что новое производное пиридоксина В6NO, обладающее антиоксидантными и NO-донорными свойствами, снижает кардиотоксический эффект ДОКС на ткани сердца животных за счет активации Nrf2-зависимых путей антиоксидантного ответа и является перспективным кардиопротекторным соединением при терапии злокачественных новообразований.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, № АААА-А19-119071890015-5, № АААА-А19-119071890015-6.

РАЗЛИЧИЯ В ИЗМЕНЕНИЯХ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ГЛУТАМАТА В СЕТЧАТКЕ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ И РАЗВИТИИ РЕТИНОПАТИИ В НОЧНОЕ ВРЕМЯ И ДНЁМ

Антоненко А.К., Телегина Д.В., Колосова Н.Г.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

a.k.antonenko98@gmail.com

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – комплексное нейродегенеративное заболевание сетчатки, которое становится основной причиной потери зрения у пожилых людей, молекулярно-генетические предпосылки патогенеза которого остаются неясными. Глутаматергическая передача сигналов в сетчатке имеет решающее значение для восприятия света и регуляции циркадных ритмов. Однако информации о роли глутаматергической системы в процессе старения и тем более на разных стадиях развития ВМД крайне мало. Цель работы – оценить изменения глутаматергической системы в сетчатке крыс с возрастом и при развитии ВМД-подобной ретинопатии в ночное время и днем, используя линию преждевременно-стареющих крыс OXYS, которая позволяет исследовать ВМД на разных стадиях: доклинической (возраст 20 дней), в период манифестации (3 мес.) и активной прогрессии (16 мес.) заболевания. Как контроль использовали крыс Вистар.

В работе показано, что развитие ретинопатии у крыс OXYS сопровождается сглаживанием суточного ритма глутамата. Кроме того, выявлены различия тенденций изменений белкового уровня ферментов синтеза (глутаминаза) и распада (глутаминсинтетаза) глутамата, его транспортера, регулирующего обратный захват (GLAST) и субъединицы $\alpha 1$ рецептора NMDA в дневное и ночное в сетчатке крыс OXYS. Так, методом Вестерн-блота показано, что в дневное время на поздней стадии ретинопатии у крыс OXYS уровень белка глутаминазы был выше, а уровень глутаминсинтетазы ниже, чем у крыс Вистар. В ночное время, в отличие от дневного, уровень глутаминсинтетазы повышался с возраста 3 до 18 месяцев у крыс OXYS, а уровень глутаминазы достоверно не изменялся у крыс обеих линий. Днем уровень белка рецептора NMDAR1 у крыс не различался с возрастом и между линиями, тогда как в ночное время наблюдается повышение уровня NMDAR1 с возрастом у крыс OXYS. Важно отметить, что развитие ВМД-подобной ретинопатии у крыс OXYS сопровождалось сниженным, по сравнению с крысами Вистар, уровнем транспортера глутамата GLAST в дневное время и снижением к возрасту 18 месяцев уровня белка GLAST в ночное время. В целом, полученные результаты указывают на то, что развитие ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне дисфункции глутаматергической системы и нарушение ее суточных ритмов, которая усиливает нейродегенеративные изменения в сетчатке.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-15-00047.

МОТОРНЫЙ ДЕФИЦИТ ПРИ ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МПТП

Артемова В.С., Пестерева Н.С., Карпенко М.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

lerochek1999@gmail.com

Болезнь Паркинсона (БП) — это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции. Разработка животных моделей БП необходима для понимания основных механизмов заболевания и для тестирования потенциальных методов лечения. Модель БП на крысах с введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МРТП) внутрибрюшинно широко используется благодаря способности воспроизводить многие патологические признаки, наблюдаемые при БП человека. Интрацеребральное введение МРТП крысам должно вызывать избирательную и необратимую потерю дофаминергических нейронов в черной субстанции и привести к моторному дефициту. Моторный дефицит можно оценить с помощью различных поведенческих тестов, в том числе используя Pole Test.

Pole Test («Шест») — это поведенческий тест, используемый для оценки двигательной функции грызунов. Во время теста крысы помещаются на вершину шеста головой вниз и естественным образом спускаются, их поведение при спуске оценивается. Каждая крыса трижды спускалась с шеста. Средний балл подсчитывался и записывался. Критерии оценки данного теста: 0 – крыса использует все конечности, чтобы плавно спуститься по шесту, 0,5 – пошаговое ползание вниз по спирали, но со скольжением задних ног, 1,0 – делает паузу несколько раз, чтобы спуститься, но может крепко держаться за шест, 1,5 – скользит по шесту и падает, 2,0 – не способна держаться за шест, сразу падет.

Целью работы было установить эффективность данной животной модели с помощью поведенческого тестирования «Шест» в течение срока в 35 дней.

В эксперименте задействованы 15 половозрелых самцов крыс Wistar, которых случайным образом распределили на 3 группы по 5 голов в каждой. Животные контрольной («1») группы были интактными, ложно-оперированной («2») группе интрацеребрально вводился физиологический раствор в объеме 4 мкл, оперированной («3») группе интрацеребрально в область черной субстанции вводилось 0.025 мг МПТП в объеме 4 мкл. Поведенческий тест «Шест» проводился на 2, 3, 5, 9, 16, 21, 26, 30, 35 дни после операции. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего (значение p), сравнение проводилось с помощью двухфакторного анализа ANOVA с последующим применением *post hoc* критерия Тьюки.

На 2 день разница между «3» и «1» группами в 13 раз ($p < 0,0001$), на 3 день между «2» и «1» группами в 13,75 раз ($p < 0,0001$), между «3» и «1» группами в 18,00 раз ($p < 0,0001$). На 5 день моторный дефицит группы «1» составил 0, «2» группа по сравнению с «1» $1,38 \pm 0,22$ ($p < 0,0001$), «3» группа по сравнению с «1» $1,73 \pm 0,22$ ($p < 0,0001$). На 9 день средний балл группы «1» составил 0, «2» по сравнению с «1» $1,29 \pm 0,32$ ($p < 0,0001$), «3» по сравнению с «1» $1,63 \pm 0,32$ ($p < 0,0001$). На 16 день разница между «2» и «1» в 20,62 раз ($p < 0,0001$), «3» и «1» в 25,00 раз ($p < 0,0001$). На 21 день моторный дефицит группы «1» составил 0, «2» по сравнению с «1» $1,33 \pm 0,12$ ($p < 0,0001$), «3» по сравнению с «1» $1,73 \pm 0,25$ ($p < 0,0001$). На 26 день разница между группами «2» и «1» в 7,19 раз ($p = 0,0197$), между «3» и «1» в 14,00 раз ($p < 0,0001$), между

«3» и «2» группами в 1,95 раз ($p=0,0046$). На 30 день средний балл группы «1» составил 0, «2» по сравнению с «1» $1,00\pm 0,68$ ($p=0,0008$), «3» по сравнению с «1» $1,90\pm 0,22$ ($p<0,0001$), между «3» и «2» группами в 1,90 раз ($p=0,0054$). На 35 день моторный дефицит группы «1» составил 0, «2» по сравнению с «1» $1,29\pm 0,52$ ($p<0,0001$), «3» по сравнению с «1» $1,83\pm 0,17$ ($p<0,0001$).

Таким образом, интрацеребральное введение МРТР крысам в черную субстанцию в концентрации 0.025мг приводит к видимым моторным нарушениям по результату поведенческого тест «Шест».

ПРИРОДНЫЕ ИСТОЧНИКИ БЕЛКА С НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Артыкбаева Г.М., Ялалова И.Р., Мамаджанов А., Саатов Т.С.

Институт биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана
им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан

gulnoraar@rambler.ru

Фактор роста нервов (ФРН) необходим для развития и фенотипического поддержания нейронов в периферической и центральной нервной системе. В центральной нервной системе наибольшее количество ФРН производится в коре, гиппокампе и в гипофизе; хотя значительные количества этого нейротропина также производятся в других областях, включая базальные ганглии, таламус, спинной мозг и сетчатку. Как правило, ФРН присутствует в тканях в небольших физиологических концентрациях. Большие количества ФРН содержат подчелюстные железы мышей самцов и африканского грызуна *Mastomus natalensis*, яды змей, предстательная железа морской свинки, семенная плазма быка.

Нами проводились работы по выделению и идентификации нейротрофинов, в частности фактора роста нервов из различных биологических объектов (подчелюстной слюнной железы половозрелых мышей-самцов, нативного стекловидного тела из глаз быка). Гомогенаты подчелюстных желез центрифугировали в течение 30 мин при 3 000 об/мин при +4°C. Разделение проводили с помощью хроматографии на колонке. Часть, отвечающая за нейротрофическую активность 2,5S равная 26 кДа, состоит из двух бета-субъединиц. Полученные фракции подвергались тестированию на культуре спинальных ганглий 8-суточных эмбрионов цыплят. Присутствие ФРН определяли по появлению фибриллярного обрамления – «гало» – у эксплантатов. Длина фибриллярного обрамления измерялась в 4 направлениях. Плотность волокон оценивалась по 5-бальной шкале. Показано, что фактор, выделенный из подчелюстных слюнных желез мышей, дает ореол радиально растущих нервных отростков, оцениваемых в +4 балла по шкале Фентона. Далее, исследование эксплантатов спинальных ганглиев показало, что нативное стекловидное тело из глаз быка (*Bos taurus*) обладает выраженной нейротрофической активностью, а коммерческий препарат такой активностью не обладает. Нейротрофическая активность проявляется в том, что ветвление и рост нервных волокон в зоне роста при влиянии нативного стекловидного тела значительно выше первичного эксплантата. Различия можно объяснить способом приготовления коммерческого препарата, при котором большая часть биологически активного белкового материала разрушается.

ВЛИЯНИЕ КСИМЕДОНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ *EX VIVO* И НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ *IN VIVO*

**Беляев Г.П., Парфенов А.А., Выштакалюк А.Б., Шашин М.С.,
Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В.**

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное
подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

gregoir4@gmail.com

Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-N-(2-гидроксиэтил)пиримидин-2-он, далее (1) – отечественный лекарственный препарат, известный в клинике как послеожоговый стимулятор регенерации. Однако вопрос о механизме действия (1) остаётся открытым. В работе других авторов было показано, что (1) влияет на активность аденилатциклазы и уровень цАМФ в клетках. В связи с этим мы предположили, что стимулирующий эффект (1) опосредован воздействием на рецепторы клетки, связанные с аденилатциклазой и G-белком, такие как адренергические или P2Y рецепторы. Таким образом, целью данной работы была проверка о влиянии (1) на адренергические рецепторы клетки.

Для изучения влияния (1) на рецепторы клетки мы использовали изолированные сегменты тонкой кишки самцов крыс линии Wistar (n=18) и установку для изолированных органов Radnoti Tissue-Organ Bath. Также нами исследован уровень глюкозы с помощью глюкометра в крови крыс на фоне воздействия (1).

Известно, что воздействие на адренергические или P2Y рецепторы вызывает расслабление гладкой мускулатуры кишечника, а также может изменять уровень глюкозы крови. В нашей работе было показано, что амплитуда сокращения кишечника под воздействием (1) в концентрации 6 мг/мл снизилась на 58% относительно исходного значения спонтанной сократительной активности тонкой кишки, что схоже с воздействием адреналина в концентрации 0.01 мг/мл, который снизил амплитуду спонтанной сократительной активности на 94% относительно исходного значения. Кроме того, (1) влияет на уровень глюкозы в крови крыс. Показано, что по прошествии 30 мин после внутрибрюшинного введения (1) в дозе 75 мг/кг или адреналина в дозе 1.5 мкг/кг на 30% повышается ($p < 0.05$) уровень глюкозы в крови относительно контрольной группы, которой вводили физ. р-р в дозе 1 мл/кг ($135.7 \pm 7.3\%$ и $136.9 \pm 9.9\%$ соответственно против $104.5 \pm 6.9\%$ от исходного уровня глюкозы).

Таким образом, в нашей работе было показано, что (1) способен влиять на рецепторы клеток, изменяя уровень глюкозы в крови и угнетая сократительную активность гладкой мускулатуры кишечника крысы.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Бороздина Н.А.

Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

natalia.borozdina2016@yandex.ru

На данный момент не существует адекватной экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа, которая бы соответствовала клиническим характеристикам. Валидация модели стандартной терапией очень важна для поиска новых лекарственных средств. Препаратом первой линии в терапии сахарного диабета 2 типа является метформин. Механизм действия метформина связан с его способностью подавлять глюконеогенез, а также образование свободных жирных кислот и окисление жиров, повышает чувствительность периферических рецепторов к инсулину и утилизирует глюкозу клетками.

Целью исследования являлась разработка и валидация модели метаболического синдрома по типу сахарного диабета 2 типа.

Метаболический синдром у самцов мышей линии C57Bl/6 достигался путем высокожировой диеты в течение 21 недели. Начиная с 18 недели, метформин вводился группе на высокожировой диете в течение 4 недель ежедневно, 1 раз в сутки в дозе 200 мг/кг перорально. Группе животных на стандартной диете и другой половине животных на высокожировой диете перорально в аналогичном режиме вводился носитель – дистиллированная вода.

Для контроля развития метаболического синдрома у животных еженедельно измерялся уровень глюкозы и прирост массы тела. На 17, 19 и 21 неделю у животных проводился тест на толерантность к крахмалу, инсулинорезистентный тест, проведены функциональные тесты: локомоторная активность, сила хватания (Grip Strength), ацетоновый тест (холодовая аллодиния), Фон-фрей (механическая аллодиния), горячая пластина (аллодиния к нагреванию). В конце эксперимента животные подвергались эвтаназии с последующим вскрытием и тотальным забором крови для оценки состояния органов и дальнейшего биохимического анализа сыворотки.

В результате у мышей линии C57Bl/6 путем соблюдения высокожировой диеты удалось создать модель метаболического синдрома по типу сахарного диабета 2 типа. Введение метформина позволило восстановить до контрольного уровня биохимические и физиологические показатели у животных. Разработанная модель может быть полезна в поиске новых гипогликемических препаратов для сахарного диабета и препаратов, нацеленных на лечение диабетической нейропатии.

ДИНАМИКА ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В КЛЕТКАХ КРОВИ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИЕСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Валеева Е.В.¹, Галеева А.Г.^{2,3}, Семина И.И.¹, Никитин Д.О.¹, Кравцова О.А.³

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности,
Казань, Россия

³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

vevaleeva@ya.ru

В последнее время наблюдается повышенный интерес к теломерам как маркерам, связанным не столько с естественным старением клеток, сколько к маркерам воздействия различных стрессовых факторов. В связи с этим, целью работы явилась оценка изменения абсолютной длины теломер клеток венозной крови крыс в моделях хронического стресса.

Для моделирования хронического стресса были сформированы 4 группы крыс: 1 – контроль (8 самок, 12 самцов); 2 – крысы, которые подвергались вынужденному плаванию с грузом (ВП, 8 самок, 12 самцов); 3 – животные, переносившие иммобилизационный стресс (ИС, 7 самок, 15 самцов); 4 группа – крысы, которые подвергались комплексной комбинации тестов из 2-ой и 3-ей групп (ВП+ИС, 11 самок, 15 самцов). Плавание производилось 2 раза в неделю в течение 270 дней длительностью 7 минут с массой груза 8% от массы тела животного. Иммобилизационный стресс моделировали каждые 3 месяца ежедневной 90-минутной иммобилизацией на протяжении 14 дней в специальном пенале-фиксаторе. Забор крови производился вначале эксперимента, на 90, 180 и 270 день. Биоматериалом являлась ДНК, выделенная из цельной крови крыс (ДНК-сорб-В, Интерлабсервис). Абсолютную длину теломер определяли набором «Absolute Rat Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit» (ScienCell, США) методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 (BioRad, США).

При наблюдении за изменениями в каждом возрастном периоде установлено, что самки, подвергаемые ИС и комбинированным воздействиям стресс-факторов, к 180 суткам имели длиннее теломеры по сравнению с контролем ($p=0,018$). В других группах значения на 90 и 270 сутки изменений испытуемых групп относительно контрольной не наблюдалось. В ходе всего эксперимента было отмечено, что у особей женского пола, подвергаемых ИС и ВП+ИС, отмечалось увеличение длины теломер на 180 сутки относительно предыдущего периода ($p=0,018$ и $p=0,002$, соответственно). У самцов в группах ИС и ВП+ИС на 90 сутки теломеры значимо редуцировались, к 180 суткам – удлинялись, а к 270 суткам в ответ на стрессорное воздействие длина теломер сокращалась.

Таким образом, иммобилизация и комбинированное воздействие стрессовых факторов приводит к резкому увеличению абсолютной длины теломер как у самцов, так и у самок на 180 сутки воздействия с последующим резким их укорочением к концу эксперимента до значений, сопоставимых с контрольной и ВП группами. Согласно литературе, в отличие от клеток человека большинство клетки тканей грызунов имеют активную теломеразу. Возможно, что наблюдаемое удлинение теломер являлось следствием повышенной активности теломеразы в клетках крови из-за компенсаторного механизма в ответ на повторный хронический стресс.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-25-00325.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ СА3 НА РАЗДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АНСАМБЛЕЙ ВО ВРЕМЯ РИППЛ-ОСЦИЛЛЯЦИЙ

Васильев А.О., Мысин И.Е.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино Россия

vasilev.artem.8.7.03@gmail.com

Экспериментальные данные, полученные для поля СА1 гиппокампа показывают, что во время риппл-событий, высокочастотных кратковременных осцилляций (120-250 Гц) активируются различные группы пирамидных нейронов. Значительную роль в генерации риппл-событий в СА1 играет возбуждающий вход из поля СА3. Внутри функциональных ансамблей пирамидных нейронов СА3 связаны сильно и клетки активируют друг друга. Интернейроны также получают возбуждение от пирамидных клеток и тормозят последние. В связи с этим возникает вопрос о механизме, который разделяет активность нейронных ансамблей в СА3 и создает условия для активации различных групп клеток во время риппл-события в СА1. Мы исследовали разделение нейронных ансамблей в математической модели.

В качестве модели нейронов использовались модели Ходжкина-Хаксли. Сила связей между пирамидными нейронами устанавливалась с использованием нормального распределения, обратно пропорционально расстоянию между нейронами. Аналогично распределялась сила связей от пирамидных нейронов на интернейроны. Сила связей от интернейронов на пирамидные нейроны распределялась равномерно.

Модель включала в себя популяцию нейронов и синаптические связи двух видов: первый – упорядоченный, то есть нейрон наиболее сильно влиял на своих соседей по популяции, второй – случайный, в котором связи первого вида перемешивались так, что во втором ансамбле нейрон также сильно активировал своих соседей, но эти соседи не находились в популяции рядом.

В результате была определена зависимость разделения функциональных ансамблей от следующих параметров модели: сигма-параметр связей от пирамидных к пирамидальным клеткам, сигма-параметр связей от интернейронов к пирамидным клеткам, синаптические проводимости этих связей. Важное значение имел характер связи от интернейронов к пирамидным клеткам, а именно тормозили ли интернейроны всю популяцию или только близкие к себе пирамидные нейроны.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-71-10109

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Ветровой О.В.^{1,2}, Стратилев В.А.¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

vov210292@uindex.ru

Патологии развития мозга, вызванные пренатальной гипоксией, во многом определяются чрезмерной глюкокортикоидной стимуляцией плода, которая предположительно «запечатлывается» на всю жизнь на эпигенетическом уровне в нарушении чувствительности рецепции глюкокортикоидов экстрагипоталамическими структурами мозга, ведя к нарушению отрицательной обратной связи и, как следствие, завершаясь чрезмерной глюкокортикоидной стимуляцией реципиентных органов и тканей. Настоящая работа была направлена на анализ особенностей функционирования глюкокортикоидной системы в структурах мозга взрослых крыс, переживших пренатальную гипоксию (ПГ, 3 сеанса по 3 часа при 180 мм.рт.ст. с интервалами в 24 часа) на 14, 15 и 16-е сутки эмбрионального развития, а также при их реакции на слабый стресс (СС).

ПГ вызывает значительные нарушения транскрипции и трансляции глюкокортикоидных рецепторов (ГР) и ГР-зависимой транскрипции в гиппокампе и медиальной префронтальной коре, но не в амигдале, по сравнению с контролем. В ответ на СС у ПГ крыс наблюдаются слабые изменения активности глюкокортикоидной системы, в то время как у контрольных животных индуцированная СС активность глюкокортикоидной системы в этих структурах мозга сходна с таковой у интактных животных с ПГ. Нарушение активности глюкокортикоидной системы в экстрагипоталамических структурах головного мозга ПГ крыс сопровождается повышением уровня гипоталамического кортиколиберина по сравнению с контролем независимо от СС. Синтез проопиомеланокортина (ПОМК) в гипофизе и выброс адренкортикотропного гормона (АКТГ) в кровь снижаются в ответ на СС у контрольных крыс, что демонстрирует механизм глюкокортикоидной отрицательной обратной связи. В то же время в гипофизе ПГ крыс обнаружены сниженные уровни ПОМК независимо от СС.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о существенных перестройках активности глюкокортикоидной системы в структурах мозга крыс, переживших пренатальную гипоксию, предопределяющих развитие хронического депрессивно-подобного состояния, сопряженного со сниженной пластичностью реакций на внешние стимулы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) в рамках проекта Научные центры мирового уровня Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости», направление: «Биологические и социальные основы инклюзии».

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ МЕТАБОЛИЗМА L-КАРНИТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ

Володина Д.Е.¹, Гуреев А.П.^{1,2}, Попов В.Н.^{1,2}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

d.volodina.bipum.57@gmail.com

Милдронат – кардиопротекторный препарат, применяемый для лечения сердечно-сосудистых заболеваний путем переключения метаболизма с окисления жирных кислот на окисление глюкозы. Этот эффект достигается за счет ингибирования синтеза L-карнитина, распространенной добавки, которая используется для улучшения метаболизма жирных кислот. И милдронат, и L-карнитин обладают как нейропротекторным, так и кардиопротекторным эффектом, но с противоположным физиологическим действием. С использованием водного теста Морриса мы показали, что L-карнитин частично улучшал память и снижал степень повреждения мтДНК в гиппокампе мышей при воспалении, индуцированном инъекциями ЛПС (липополисахаридов). Нами было показано, что L-карнитин индуцирует митохондриальный биогенез и митофагию Nrf2-зависимым образом. Как милдронат, так и L-карнитин вызывали увеличение экспрессии генов, участвующих в поддержании митохондриального гомеостаза. При необратимых когнитивных нарушениях, возникающих при старении, милдронат улучшал долговременную и кратковременную память у 15-месячных мышей, уменьшал степень повреждения мтДНК и снижал концентрацию диеновых конъюгатов в гиппокампе, что может свидетельствовать о замедлении процессов перекисного окисления липидов.

Параллельно с этим мы показали, что добавление L-карнитина в рацион 15-месячных мышей увеличивало их силу и выносливость, и так же увеличивало экспрессию генов, ответственных за митофагию в сердце. И милдронат, и L-карнитин снижали количество диеновых конъюгатов, а милдронат вызывал увеличение количества восстановленного глутатиона и снижал количество повреждений мтДНК. Таким образом, мы наблюдали выраженный антиоксидантный эффект обоих исследуемых препаратов. Милдронат активировал экспрессию генов, регулирующих метаболизм глюкозы. Вероятно, этот метаболический сдвиг может защищать митохондрии сердца от накопления ацил-карнитина, происходящего при окислении жирных кислот в условиях дефицита кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в области научной деятельности на 2023–2025 гг. (проект № FZGU-2023-0009), стипендии Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам (проект № СП-2802.2021.4)

РОЛЬ МЕДИАЛЬНОЙ СЕПТАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ В ПОДДЕРЖАНИИ РИППЛ-ОСЦИЛЛЯЦИЙ В ОБЛАСТИ CA1 ГИППОКАМПА

Глытов И.В.^{1,2}, Попова А.С.¹, Крохалёва В.К.^{1,2}, Мысин И.Е.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

givan32@yandex.ru

На данный момент известно, что медиальная септальная область (МСО) выполняет функцию пейсмейкера гиппокампального тета-ритма. Однако и в отсутствие тета-ритма нейроны МСО проявляют спайковую активность. Имеющаяся на данный момент литература содержит противоречивые данные об изменении интенсивности риппл-осцилляций при фармакологическом подавлении МСО. Целью нашей работы было изучение влияния медиальной септальной области на интенсивность риппл-осцилляций в отсутствие тета-ритма, что может пролить свет на функции МСО, не связанные с генерацией тета-ритма.

Данные были получены в результате поведенческих экспериментов с крысами ($n=3$), подвергшимися введению лидокаина в МСО. Запись локальной полевой активности велась в поле CA1 при проведении теста «открытое поле» до и после введения лидокаина.

Поиск и анализ риппл-осцилляций проводился на участках сигнала без выраженного тета-ритма. За тета-эпохи принимались фрагменты сигнала продолжительностью от 10 секунд с отношением амплитуды сигнала, отфильтрованного в диапазоне тета-частот (4-12 Гц) к амплитуде сигнала в диапазоне дельта-частот (1-4) больше, либо равной 5. Риппл-осцилляциями считались фрагменты сигнала продолжительностью от 0.02 секунд в диапазоне 90-200 Гц, амплитуда которых превышала среднюю на 3 стандартных отклонения. Фильтрация сигнала проводилась с использованием фильтра Баттерворта 3 порядка.

Достоверный отличий между интенсивностями риппл-осцилляций у контрольных животных и животных с введённым лидокаином не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что МСО не оказывает влияния на инициацию риппл-осцилляций.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-71-10109

ПОИСК ПУТЕЙ СНИЖЕНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ИММУНОТУРБИДИМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ФЕРРИТИНА

**Динекина Е.А.^{1,2}, Михайлов Р.А.², Мирзебеков Т.А.^{2,3}, Штанчаев Р.Ш.³,
Михайлова Г.З.³, Майоров С.А.², Мурашев А.Н.¹**

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

²ООО «Антерикс», Пушкино, Россия

³ООО «Миранта Диагностикс», Пушкино, Россия

elizaveta.dinekina@gmail.com

Определение концентрации сывороточного ферритина играет важную роль в дифференциальной диагностике ряда патологий, связанных с железодефицитной анемией и воспалениями при инфекционных, ревматических и опухолевых заболеваниях. Наиболее распространенным методом, применяемым в клинико-диагностических лабораториях для анализа ферритина, является латекс-усиленная иммунотурбидиметрия (ИТМ) – фотометрическое измерение динамики оптической плотности реакционной среды в ходе агглютинации микрочастиц, покрытых антителами против ферритина. Степень агглютинации, вызванной присутствием ферритина в пробе (сыворотке крови), пропорциональна его концентрации и определяется на основе калибровочной кривой.

В отличие от калибровочных стандартов, гарантированно лишенных интерферирующих агентов, сывороточные пробы содержат целый комплекс примесей, которые потенциально способны вызывать неспецифические кросс-реакции. Одним из таких агентов является ревматоидный фактор (РФ) – группа аутоантител, образующих иммунные комплексы с собственными иммуноглобулинами G (IgG). Ранее, на основе переменных доменов кроличьих Fab-антител с высоким сродством к ферритину человека и константных доменов человеческого IgG было создано полноразмерное антитело, которое хорошо зарекомендовало себя в ИТМ ферритина. Однако присутствие РФ в пробах приводило к ярко выраженным ложноположительным результатам из-за его высокой аффинности к используемому антителу.

Было предположено, что задачу подавления интерферирующего влияния РФ можно решить с помощью конкурентного ингибирования (путем добавления нормализованного иммуноглобулина человека в реакционный буфер), либо с помощью отщепления Fc-участка антитела путем пепсинизации рекомбинантного анти-ферритинового IgG. Нормализованный IgG человека (АО «НПО Микроген», Россия) подвергали термообработке при 57°C в течение 16 часов с последующей ультразвуковой дезагрегацией для улучшения связывания с РФ и добавляли в реакционный буфер до концентрации 0.02%. Модификацию целевого антиферритина проводили в среде с pH 4.0 при 37°C в течение 24 часов в весовом отношении антитела к пепсину = 50 к 1 с последующей заменой буфера диафильтрацией на колонке с границей отсечения 50 кДа.

Показано, что добавление нормализованного иммуноглобулина заметно снижает выраженность ложноположительной реакции в присутствии до 100 МЕ/мл РФ, однако превышение фоновых оптических сигналов сохранялось (до 3-10 крат относительно коммерческого набора сравнения). Напротив, применение антител в формате Fab (2) сопровождалось полным подавлением неспецифического влияния РФ на измерение концентрации ферритина. Более того, измеренное значение немного снижалось по мере

сопровождалось полным подавлением неспецифического влияния РФ на измерение концентрации ферритина. Более того, измеренное значение немного снижалось по мере увеличения содержания РФ в пробе до 435 МЕ/мл (соответственно, до $\approx 8.5\%$ от концентрации ферритина в пробе без РФ). Таким образом, предположение о значимом вкладе Fc-компонента IgG в формирование иммунных комплексов с РФ подтвердилось, и удаление Fc, с получением антител в формате Fab (2), позволяет исключить перекрестную реакцию с РФ, сохраняя при этом возможность полноценно использовать Fab (2) в качестве инструмента для определения содержания ферритина в крови методом ИТМ.

ВЛИЯНИЕ ИЗОФОРМ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ PI3K НА Ca^{2+} -СИГНАЛЫ, ИНИЦИИРУЕМЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОМ

Дымова Е.А., Котова П.Д.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

dymova.ek.a@gmail.com

Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы участвуют в самых разнообразных физиологических процессах. Известно, что мускариновые рецепторы M1, M3, M5 сопряжены с фосфоинозитидным путем трансдукции сигнала, который может модулироваться рядом киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K). В данной работе мы исследовали влияние изоформ-специфических ингибиторов PI3K на Ca^{2+} -сигналы, инициируемые ацетилхолином в клетках НЕК293. Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в одиночных клетках проводили с помощью флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fluo-8 методом микрофотометрии. На стимуляцию ацетилхолином клетки отвечали генерацией Ca^{2+} -ответов, которые полностью блокировались в присутствии антагониста M3-рецепторов, т.е. за чувствительность НЕК293 к ацетилхолину ответственны M3-рецепторы. Также исследуемые Ca^{2+} -ответы полностью подавлялись ингибиторами AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36, специфическими по отношению к изоформам PI3K-beta, -gamma и -delta соответственно. Наиболее эффективным оказался LTURM 36, который в концентрации 10 мкМ блокировал ответы около 50% клеток, концентрации полуэффекта для AZD 6482 и AS 605240 составляли приблизительно 30 и 40 мкМ соответственно. В то же время ингибитор PI3K-alpha (GSK 1059615) не блокировал исследуемые Ca^{2+} -ответы. Формально полученные результаты свидетельствуют о том, что в генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин принимают участие все изоформы PI3K, кроме alpha. Однако подавление ответов происходило при одновременной аппликации ингибитора с агонистом, тогда как обычно ингибирование внутриклеточных мишеней требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану и его накопления в цитозоле. Кроме того, ни один из ингибиторов PI3K не блокировал Ca^{2+} -ответы на АТР, которые также генерируются при участии фосфоинозитидного пути. Таким образом, подавление Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин исследуемыми соединениями вероятно обусловлено их действием не на PI3K, а непосредственно на M3-рецептор. Если это действительно так, то эффективность связывания соединений, считающихся специфическими ингибиторами PI3K, с M3-рецепторами описывается рядом: LTURM 36 > AZD 6482 > AS 605240.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-75-10068.

ВЛИЯНИЕ ПРЯМОЙ ОПТИЧЕСКОЙ ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА НА КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ МИКРОГЕМОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА

Ератова Л.В., Маковик И.Н., Дрёмин В.В.

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орёл, Россия

eratovalyuv@gmail.com

Сегодня активно проводятся исследования по изучению влияния активных форм кислорода (АФК) на организм человека, и интерес к данному вопросу вполне обоснован ввиду неоднозначности их воздействия. Помимо продуктов восстановления молекулярного кислорода, к АФК также относится его синглетная форма, представляющая собой возбуждённое состояние кислорода. Нетипичная электронная конфигурация внешнего энергетического уровня объясняет высокую реакционную способность синглетного кислорода (СК), что может являться причиной его специфических свойств.

На способности СК изменять сосудистое русло, вызывая окклюзию сосудов и застой крови, основана фотодинамическая терапия (ФДТ). Однако используемый в современной ФДТ метод генерации СК с применением фотосенсибилизаторов (ФС) не даёт точного ответа, связан ли эффект с вкладом СК, а не других образующихся в процессе процедуры АФК. Во избежание данного фактора актуальным становится вопрос генерации СК напрямую без задействования токсичных ФС, что позволит выявить непосредственное влияние синглетной формы на сосудистое русло, а в дальнейшем предложить усовершенствованную технологию проведения ФДТ в практической медицине для лечения опухолевых заболеваний и сосудистых аномалий. В качестве такого метода может выступать прямая оптическая генерация СК, индуцированная лазерным излучением на длине волны возбуждения молекулярного кислорода 1267 нм.

Ранее были проведены исследования по изучению влияния СК на параметры сосудистой сети, которые позволили заключить, что данная форма кислорода приводит к вазоконстрикции. Однако требуется дополнительный анализ влияния параметров лазерного излучения на продукцию СК и оказываемый нагрев для достижения большей эффективности при исключении вклада локального повышения температуры в наблюдаемый процесс.

Были проведены измерения с применением селективного флуоресцентного зонда SOSG для исследования влияния мощности и экспозиции лазерного излучения длиной волны 1267 нм на генерацию СК. Воздействие различными мощностями выявило большее влияние на количество выработанного СК фактора времени воздействия, чем мощности, что вероятно связано с его малым временем жизни. Для исключения влияния нагрева были проведены тепловизионные исследования на биоткани. Установлено, что увеличение нагрева пропорционально увеличению мощности излучения, а время воздействия не вносит значительных изменений в нагрев. Для последующего этапа исследований было принято решение использовать мощность лазерного излучения длиной волны 1267 нм равной 25 мВт ввиду увеличения температуры в пределах двух градусов, что не приводит к нарушению протекания физиологических процессов.

Полученные с помощью лазерной доплеровской флоуметрии результаты свидетельствуют о вкладе активных механизмов регуляции микроциркуляции при индукции СК, а в большей мере эндотелиальных и нейрогенных. При этом наблюдается увеличение

амплитуды указанных колебаний как непосредственно во время облучения, так и к концу исследования. Данный эффект может быть связан с усилением кровотока по артериоло-веноулярным шунтам при наблюдаемом повышении миогенного тонуса и последующей компенсаторной эндотелий-зависимой дилатацией капилляров после их окклюзии во время генерации СК.

Работа выполнена при поддержке РНФ в рамках проекта № 21-75-00086.

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ СВЕТОДИОДНОГО КРАСНОГО (660 нм) ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАННОМ ГНОЙНОМ АБСЦЕССЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Ефимова Е.С.¹, Полиданов М.А.², Алипов В.В., Тучина Е.С.¹,
Мусаелян А.Г.², Тахмезов А.Э.²**

¹Саратовский национальный исследовательский государственный
университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

²Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского,
Саратов, Россия

kkkatyefimova@mail.ru

Глубокие абсцессы остаются серьезной причиной заболеваемости, смертности и длительного пребывания в стационаре, несмотря на применение чрескожного дренирования и широкого использования антибиотиков. Целью данного исследования было изучить возможность фотодинамической терапии (ФДТ) для лечения инфицированных абсцессов с использованием светодиодного красного (660 нм) излучения малой мощности и суспензии метиленового синего в интралипиде в качестве фотосенсибилизатора. В работе использовали клинический антибиотико-чувствительный штамм *Staphylococcus aureus*. Микроорганизмы выращивали при температуре 37°C на ГРМ-агаре (Россия, г. Оболенск).

Источником излучения служил светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=660$ нм и плотностью мощности 30 мВт/см². Во всех экспериментах режим излучения был непрерывный. Время облучения составляло 15 мин в сутки в течение 5 ней.

Исследования проводили на базе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Саратовского медицинского университета им. В. И. Разумовского Минздрава России. В качестве биологической модели использовалась группа из 16 лабораторных животных – крыс, породы «Стандарт», возрастом 8 месяцев, массой 200±50 г. Уход за животными и проведение экспериментов осуществлялись согласно основным морально-этическим принципам проведения биомедицинских экспериментов на животных. Для создания модели гнойного абсцесса через разрез кожного покрова в межлопаточной области животного устанавливали баллон катетера с последующим введением в сформированную импровизированную полость взвеси *S. aureus* и ушиванием раны хирургическим кожным швом. Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: 1) 4 крысы – контроль, моделированный абсцесс со стандартным лечением; 2) 4 крысы – моделированный абсцесс с обработкой фотосенсибилизатором (метиленовый синий) в жировой эмульсии; 3) 4 крысы –

моделированный абсцесс обработкой облучением; 4) 4 крысы – моделированный абсцесс с обработкой фотосенсибилизатором (метиленовый синий) в жировой эмульсии и облучением.

Для оценки эффективности воздействия ежедневно проводили высеив инфильтрата из области моделированного абсцесса с последующим подсчетом численности микроорганизмов (\log_{10} КОЕ), а также изучали изменения в биохимических показателях крови на 5, 10 и 15 день после создания моделированного абсцесса. Установлено, что использование красного светодиодного излучения для чрескожной обработки области абсцесса снижает обсемененность инфильтрата на 1 \log_{10} КОЕ после первого сеанса облучения, на 4 \log_{10} КОЕ после 5 сеанса. Лучшие показатели – скорость снижения бактериальной нагрузки, редукция абсцесса, восстановление нормальных значений показателей крови – отмечены 10 день эксперимента для 4 группы животных. У групп 1 и 4 все показатели достигали нормы к 15 дню, в то время как для группы 2 восстановление произошло на 17 сутки, а для группы 3 – на 20.

Таким образом, использование жировой эмульсии в сочетании с фотосенсибилизатором является перспективным методом для повышения эффективности антимикробной ФДТ при лечении инфицированных абсцессов и открывает новые возможности для дальнейших исследований.

РАЗРУШЕНИЕ ЗУБНОГО КАМНЯ С ПОМОЩЬЮ ТОМАТА

Задорина И.И., Саченков О.А., Каюмов А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

zadorina1994@icloud.com

По сведениям ветеринарных стоматологов, образование налета у собак приблизительно происходит к 2-3 годам жизни в зависимости от породы животного. Зубной налет встречается на губной или щечной поверхности коронки зуба в области края десны и представляет полиморфное образование, которое состоит из частиц корма, полисахаридов, клеток слизистой оболочки рта, слюны, большого количества аэробной и анаэробной микрофлоры. Если налет остается на эмали зуба в течение примерно 12 дней, то он постепенно пропитывается солями и затвердевает (процесс минерализации), прочно прикрепляется к поверхности зуба образуя зубной камень.

Зубной камень представляет острую проблему в ветеринарной стоматологии домашних животных поскольку приводит к потере зубов. Если не принять меры по удалению зубного камня животных, то постепенно он увеличивается в размерах, мешает правильному смыканию челюстей и пережевыванию пищи, вызывает воспаление десны и отхождение её края от корня зуба, вследствие чего инфекция проникает вглубь и вызывает воспаление окружающих зуб тканей, вплоть до вовлечения в процесс соседних зубов, костной ткани и разрушения костей челюсти.

На сегодняшний день самым распространённым методом является чистка с помощью ультразвукового скалера, также используются и профилактические средства различные пасты, гели, игрушки, но у всех них есть ряд недостатков, такие как наркоз, стресс и аллергические реакции.

В данной работе мы использовали общедоступный продукт питания – плоды томата, которые предупреждают образование и разрыхляют зубные отложения в полости рта животного вследствие наличия в них естественных действующих компонентов, которые обладают свойствами размягчать и разрушать зубные камни.

Анализ показал, что обработка 1% суспензией томатной пасты в течение 5 дней приводит к снижению объема камня в 1.2 раз, 20 дней обработки снижает объем камня в 7.7 раз. Обработка в течение 5 дней камня на поверхности зуба приводит к разрыхлению камня и позволяет механически его удалить.

По результатам рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) происходит снижение содержания атомов кальция (Ca), фосфора (P) и увеличение содержания калия (K) в камне.

Прочность зубного камня до и после обработки суспензией томата оценивали с помощью испытательной установки, которая показала, что разрушение обработанного образца происходило уже на первом уровне (при энергии 328 ± 4 мкДж). Разрушение происходило по поперечному сколу, при этом скол характеризовался плоской поверхностью. Зубной камень без обработки не разрушался на всех уровнях.

Таким образом, плоды томата обладают свойствами размягчать и разрушать зубные камни. Подход защищен заявкой на патент РФ (№ 2023103227).

Работа выполнена за счет средств субсидий, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ СВЕТОВОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА В ОРГАНАХ КРЫС

Зайцева И.А.^{1,2}, Баишникова И.В.¹, Хижкин Е.А.^{1,2}

¹Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ Карельский научный центр РАН,
Петрозаводск, Россия

²Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

ira.irmita@yandex.ru

Нарушение циркадной ритмичности приводит к изменению различных физиологических функций организма, в том числе метаболизма липидов, с которыми тесно связан обмен жирорастворимых витаминов. α -Токоферол, являясь природным антиоксидантом, играет важную роль в процессах размножения, роста, развития, в поддержании иммунитета, особенно на ранних этапах онтогенеза. Методом ВЭЖХ исследовали содержание α -токоферола в органах самок крыс после лактации и их потомства в возрасте 2-недели, 1, 2 и 3 месяца. Самки содержались при стандартном освещении (12 часов свет/12 часов темнота) или помещались в условия постоянной темноты с начала беременности или сразу после родов. Потомство содержалось с матерями до отсадки в возрасте 3 недель и далее в тех же условиях.

Установлено, что у самок крыс, находящихся в постоянной темноте с начала беременности, уровень α -токоферола в печени был ниже, чем у животных, перемещенных в темноту после родов. У их потомства на ранних этапах постнатального онтогенеза (2 недели и 1 месяц) обнаружено более низкое содержание витамина в печени, почках, сердце, скелетной мышце и легких по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях. У потомства, помещенного в постоянную темноту сразу после рождения, содержание α -токоферола также было снижено в легких в 1-месячном возрасте.

Таким образом у крыс длительное действие постоянной темноты вызывало снижение уровня α -токоферола, что связано, вероятно, с нарушением циркадных ритмов обменных процессов и повышением уровня мелатонина в организме. В большей степени на содержание витамина у потомства повлияло отсутствие освещения с периода внутриутробного развития, поскольку в данном случае модулирующее влияние световой депривации на физиологические системы начиналось раньше.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема FMEN-2022-0003).

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВЫМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ

**Иркаева А.М.¹, Полякова Л.В.¹, Жукова Е.С.¹, Пятойкина А.С.²,
Жиляева Т.В.^{2,3}, Щербатюк Т.Г.¹**

¹Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии
Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

²Клиническая психиатрическая больница №1 г. Н. Новгорода, Нижний Новгород, Россия

³Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия

irkaeva-anastasiya@inbox.ru

Известно, что в качестве основного патологического механизма развития шизофрении может выступать окислительный стресс, вызывающий повреждение нервных клеток за счёт избыточной генерации активных форм кислорода и (или) нарушения их ферментативной нейтрализации. Поиск надёжных ранних биомаркеров, характеризующих антиоксидантный статус и активность процессов свободнорадикального окисления в организме пациентов с первым эпизодом шизофрении (длительность течения заболевания до 3-х лет) – актуальная задача персонифицированного подхода в стратегии лечения и контроля прогрессирования этого заболевания.

Целью данного исследования явилось определение наиболее информативных биомаркеров уровня интенсивности про- и антиоксидантных процессов у пациентов с первым эпизодом шизофрении. Материалы и методы. Исследуемая выборка состояла из 68 пациентов с первым эпизодом шизофрении, проходивших наблюдение в Клинической психиатрической больнице №1 г. Н. Новгорода. В качестве контрольной группы выступали психически и соматически здоровые добровольцы (N=66), сопоставимые по возрасту и полу. Активность процессов пероксидации липидов определяли в крови с помощью теста с тиобарбитуровой

кислотой (ТБК). Продукты окислительной модификации белков плазмы крови определяли по уровню карбонильных производных, регистрируемых с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Активность эритроцитарных супероксиддисмутазы определяли с использованием системы, обеспечивающей восстановление нитросинего тетразолия, и каталазы – по изменению оптической плотности в области поглощения пероксида водорода (Арутюнян и др., 2000).

Результаты. В ходе исследования установлено достоверное снижение активности каталазы у пациентов с первым эпизодом шизофрении относительно здоровых добровольцев на 54% ($p < 0,0003$, по U-критерию Манна-Уитни). Статистически значимых изменений по другим исследуемым показателям не было зарегистрировано. Однако в плазме крови у больных с первым эпизодом шизофрении отмечается тенденция повышенного содержания ТБК-активных продуктов по сравнению с контрольной группой. Заключение. Таким образом, у пациентов с шизофренией уже на начальных этапах развития заболевания в крови наблюдается дефицит в ферментативной активности каталазы. Это свидетельствует о том, что данный показатель может выступать значимым маркером окислительной напряженности в патогенезе шизофрении.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-015-00420 (руководитель Мазо Г.Э.).

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛА 3-О-ГАЛЛОИЛ-4,6-ГЕКСАГИДРОКСИДИФЕНОИЛ- β -D-ГЛЮКОЗЫ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Исамухамедова Д.Р.¹, Эргашев Н.А.¹, Рахимов Р.Н.², Шокиров Р.К.³, Асраров М.И.¹

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент, Узбекистан

²Институт биорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

³Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

dildoraisamuxamedova@gmail.com

В последнее время пристальное внимание исследователей привлекают продукты вторичного метаболизма растений, такие как полифенольные соединения, в связи с широким спектром их биологического действия. Они обладают антиоксидантным, мембранотропным, цитопротекторным, иммуномодулирующим, антибактериальным, антиканцерогенным, противовоспалительным и другими свойствами.

Целью данного исследования является изучение влияния полифенола 3-о-галлоил-4,6-гексагидроксиdifеноил- β -D-глюкозы на окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс в опытах *in vitro*.

Митохондрий из печени взрослых крыс выделяли по методу дифференциального центрифугирования [Schneider, Hogeboom, 1951]. Определение скорости дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях и величин коэффициентов дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О проводили по методу Чанса. При расчете скорости дыхания и параметров окислительного фосфорилирования, содержание кислорода в 1 мл среды принимали равным 500 нг-атомам кислорода при 26°C. Содержание белка митохондрий определяли по методу Биурета [Watters, 1978].

В экспериментах по изучению действия полифенола 3-о-галлоил-4,6-гексагидроксифеноил- β -D-глюкозы на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий в субстратах глутамат+малат было показано, что полифенол в концентрациях 10 и 20 мкМ в состоянии V_3 процесса окислительного фосфорилирования митохондрий уменьшал на 14,3% и 23,7%, а при 30 мкМ концентраций увеличивал на 13,3% по сравнению с контролем, соответственно. Также при действии полифенола при концентрации 10 мкМ в состоянии V_4 процесс окислительное фосфорилирование митохондрий уменьшался на 15,1%, а при 20 и 30 мкМ концентрации увеличивался на 11,8% и 66,3% по сравнению с контролем, соответственно. Однако было обнаружено, что при действии полифенола при концентрации 10 мкМ значение ДК оставался на уровне контроля, а в концентрации 20 и 30 мкМ повышался на ~30% по сравнению с контролем. Также показатель АДФ/О при действии полифенола в концентрациях 10, 20 и 30 мкМ уменьшился на 15,5%, 24,5% и 34,0% по сравнению с контролем, соответственно.

Таким образом, исходя из полученных данных, следует заключить, что полифенол, несмотря на свои антиоксидантные свойства, при увеличении концентраций стимулирует дыхание в состояниях V_3 и V_4 и разобщает процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях печени крыс. «Мягкое разобщающие» действия на окислительное фосфорилирование было показано и другими полифенольными соединениями.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛА ГЕРАНИИНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ РАСТЕНИЙ *EUPHORBIA FRANCHETII*, НА Ca^{2+} -ЗАВИСИМУЮ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ МЕГАПОРУ

Исамухамедова Д.Р.¹, Эргашев Н.А.¹, Рахимов Р.Н.², Асраров М.И.¹

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент, Узбекистан

²Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

dildoraisamuxamedova@gmail.com

Одной из уникальных особенностей функции митохондрий является участие в окислительно-восстановительных реакциях в клетках и поддержание внутриклеточного баланса организма. В связи с этим одним из важнейших факторов является выявление растительных биологически активных веществ, влияющих на функциональное состояние митохондрий. В последние годы показано, что различные полифенольные вещества, выделенные из растений, оказывают эффективное влияние на антиоксидантную систему митохондрий и их ион-транспортные системы и широко используются при лечении различных заболеваний.

Целью данного исследования является изучение влияния полифенольного вещества гераниина, выделенного из растения *Euphorbia Franchetii*, на циклоспорин А-чувствительные мегапоры в митохондриях.

Митохондрии печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования [Schneider, Hogeboom, 1951]. Состав среды выделение: 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-хлорида, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4. Количество белка в митохондриях печени определяли биуретовым методом [Watters, 1978]. Скорость набухания митохондрий определяли на спектрофотометре при 540 нм. Состав среды инкубации: сахароза – 200 мМ, KH_2PO_4 – 1 мМ, сукцинат – 5 мМ,

Ca^{2+} -EGTA-буфер 20 – мкМ, Нерес – 20 мМ, трис-НСl – 20 мМ, ротенон – 2 мкМ, рН-7,2 [He, Lemasters, 2002]. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программы *Origin 6.1 (USA)* с вычислением средней арифметической величины (M) и стандартной ошибки по $se (m)$ показаний.

В исследованиях изучалось влияние концентраций полифенола гераниина 50, 100, 150 и 200 мкМ на состояние Ca^{2+} -зависимой мегапоры митохондрий печени крысы. В экспериментах при изучении мегапоры митохондрий печени крысы добавлением в среду инкубации 10 мкМ Ca^{2+} митохондриальная мегапора проходит в открытое конформационное состояние по сравнению с контролем, и эта величина принималась за 100%. По предварительным данным, концентрация полифенола гераниина 50 мкМ ингибировала Ca^{2+} -зависимое состояние мегapor в митохондриях на $9,0 \pm 1,6\%$. Установлено, что под влиянием концентраций полифенолов 100 и 150 мкМ переход мегапоры в открытое конформационное состояние ингибируется на $16,3 \pm 1,1\%$ и $42,7 \pm 4,1\%$ соответственно. Установлено, что под действием концентрации полифенола 200 мкМ открытое конформационное состояние мегапоры ингибируется на $71,5 \pm 4,1\%$. Полумаксимальная ингибирующая концентрация полифенола составляла $\text{IC}_{50} = 160,7$ мкМ.

Из полученных данных можно сказать, что это полифенольное соединение, как и другие полифенолы, в исследованных концентрациях оказывало концентрационно-зависимое ингибирующее действие на мегапоры митохондрий печени крысы и проявляло мембраноактивное свойство.

АССОЦИИИ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА И РЕПРОДУКТИВНОГО УСПЕХА У ПОРОД ДОМАШНЕГО КРОЛИКА

Киташова М.И.

Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева,
Москва, Россия

mariya.kolazh@gmail.com

Кролиководство – активно развивающаяся отрасль сельского хозяйства. Основным препятствием на пути повышения продуктивности кролиководства является нарушение воспроизводительной функции и ранняя смертность животных. Существенную роль в этих нарушениях играет геномная нестабильность, которую можно оценить при помощи микроядерного теста. Он широко используется для оценки генетически обусловленных особенностей геномной нестабильности, а также для мониторинга последствий действия мутагенных факторов самой различной природы. Описана связь между геномной нестабильностью хромосомного аппарата соматических клеток и проблемами воспроизводства у разных видов млекопитающих, в том числе и у человека. Для изучения особенностей такой связи в настоящей работе выполнен сравнительный анализ результатов микроядерного теста в эритроцитах у кроликов 3-х пород (белый великан, советская шиншилла и калифорнийская) с такими характеристиками их воспроизводства, как процент «пустых» скрещиваний, мертворождений и среднее количество потомства. Из полученных нами данных следует, что относительно двух других пород, повышенная частота

встречаемости эритроцитов с микроядрами у самцов калифорнийской породы совпадает с высокой частотой встречаемости пропустовавших самок после случки, при отсутствии отличий по такой характеристике воспроизводства, как смертность новорожденных. Можно ожидать, что пониженный репродуктивный успех самок калифорнийской породы является следствием геномной нестабильности хромосомного аппарата у самцов. Результаты исследований свидетельствуют о том, что малозатратный и быстрый микроядерный тест может быть достаточно успешным для прогноза воспроизводительной функции у особей различных пород домашнего кролика, особенно у самцов.

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ IP₃-РЕЦЕПТОРА В АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ Ca²⁺-СИГНАЛИЗАЦИИ

Кочкина Е.Н., Копылова Е.Е., Колесников С.С.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

kate-kochkina@yandex.ru

Агонист-индуцированные внутриклеточные Ca²⁺-сигналы генерируются посредством выброса Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума (ЭР, Ca²⁺-депо) через IP₃-активируемые Ca²⁺-каналы (IP₃R). IP₃R представляют собой гомотетраммерные структуры, состоящие из субъединиц трех изоформ (IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3). Изоформы IP₃R различаются чувствительностью к IP₃ и Ca²⁺ и особенностями в механизмах регуляции. В данной работе мы исследовали роль каждой изоформы IP₃R в агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации.

Ранее с помощью технологии CRISPR/Cas9 нами были получены моноклональные линии клеток НЕК293 с единственной функциональной изоформой IP₃R. Проведение физиологических исследований заключалось в мониторинге внутриклеточного Ca²⁺ в одиночных клетках с помощью флуоресцентного Ca²⁺-зонда Fluo-4 методом микрофотометрии. В ходе работы нами были проанализированы клетки НЕК293 дикого типа (WT), в которых функциональны все три изоформы IP₃R, а также клетки моноклональных линий IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3, в каждой из которых функционировал IP₃R только одной изоформы.

Клетки всех четырех линий генерировали Ca²⁺-ответы на ацетилхолин (ACh) по принципу «всё или ничего». Пороговая концентрация ACh составляла для клеток WT и IP₃R2 примерно 250 нМ, для IP₃R1 – 0,5 мкМ, для IP₃R3 – 1 мкМ. Лагпериоды ответов (время, необходимое для достижения половины максимального значения ответа) градуально уменьшались при увеличении концентрации агониста. Таким образом, ряд чувствительности модифицированных клеток к ACh соответствовал описанному в литературе ряду аффинностей IP₃R изоформ к IP₃: IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3. Также для оценки вклада IP₃R в утечку Ca²⁺ из ЭР мы провели классический тапсигаргиновый тест. Оказалось, что в случае клеток IP₃R1 и IP₃R2 скорость Ca²⁺-утечки из Ca²⁺-депо была значительно ниже по сравнению с клетками WT и IP₃R3. Это свидетельствует о том, что спонтанная активность изоформы IP₃R3 вносит существенный вклад в утечку Ca²⁺ из ЭР в покоящихся клетках НЕК293.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-14-00031.

НОВЫЙ ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ТЕСТ «УКРЫТИЕ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Крохалёва В.К.^{1,2}, Попова И.Ю.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Медико-биологический факультет РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

v.krohaleva03@mail.ru

Поведенческие тесты для выявления психоневрологических нарушений у лабораторных мышей разработаны недостаточно. Классические тесты на тревожность, такие как Открытое поле и Приподнятый крестообразный лабиринт, зачастую не выявляют достоверных различий между контрольными животными и животными с умеренным стрессом, а также на ранних стадиях нейропатологий. Отсутствие показательных и простых поведенческих тестов для выявления психоневрологических нарушений у лабораторных животных затрудняет как изучение механизмов развития патологий, так и разработку терапевтических подходов.

Целью данной работы была разработка поведенческого теста, выявляющего психоневрологические изменения у лабораторных мышей, подвергнутых социальной депривации, которая является одним из наиболее простых и эффективных способов моделирования стресса. Нарушения, возникающие у мышей при социальной депривации, во многом схожи с таковыми на ранних стадиях болезни Альцгеймера.

Исследования проводились на мышах BALB/c (самцах весом 25–33 г) из питомника «Столбовая». Для видеорегистрации и анализа поведения использовали программы EthoVision (Noldus Information Technology, Нидерланды) и RealTimer (Open Science, Россия).

Тест «Укрытие» основан на естественном предпочтении грызунов безопасного укрытия открытому пространству и представляет собой открытую квадратную арену (60х60см), в одном из углов которой находится прямоугольное укрытие (30х12х5,5см). Укрытие имеет верхнее отверстие для помещения животного в начале эксперимента и один выход на арену, напротив которого находится пищевое вознаграждение для стимулирования выхода мыши из укрытия. Для проверки значимости пищевого вознаграждения половина животных в каждой группе была лишена корма за 12 ч. до тестирования. Поведение каждого животного регистрировали в течение 3 мин.

Анализ показал, что 44,4% социально-депривированных мышей не покидают укрытие, что свидетельствует о высоком уровне их тревожности по сравнению с контрольной группой, в которой все мыши выходили из укрытия. Исследовательское поведение снижалось в 10 раз: у контрольных мышей оно составляло 16,3 % от общего времени эксперимента, а у социально-депривированных мышей только 1,43 % ($p < 0.05$). При этом пищевая депривация достоверно снижала исследовательское поведение у контрольных животных за счет увеличения интереса к еде (мыши на 23,4% времени больше проводили у еды), тогда как у социально-депривированных животных пищевая депривация на интерес к пище не влияла.

Использованный для сравнения тест «Открытое поле» (квадратная арена 60х60см) не выявил различий в поведении контрольной и социально-депривированной группами животных ($p > 0.05$).

Таким образом, нами разработан новый поведенческий тест «Укрытие», выявляющий достоверные различия между контрольными и социально-депривированными животными. Определены параметры, наиболее точно отражающие изменения в поведении социально-депривированных мышей. Тест «Укрытие» может быть полезен для исследования поведения животных на ранних стадиях экспериментальных нейропатологий, при которых наблюдаются психоневрологические нарушения.

ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ВЕЩЕСТВ ИЗ КЛАССА ПОЛИФЕНОЛОВ НА ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ У МЫШЕЙ

Крутских Е.П.¹, Гуреев А.П.^{1,2}, Попов В.Н.^{1,2}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

kru751@rambler.ru

На сегодняшний момент среди веществ натурального происхождения, обладающих нейропротекторными эффектами, популярностью пользуются полифенолы, которые содержатся в винограде, маслах, зеленом чае, разнообразных приправах и так далее. Однако несмотря на эффект, который они оказывают в отношении нервной системы, точный механизм их влияния до конца не изучен. Хорошо известно, что полифенолы являются мощными антиоксидантами, могут активировать сигнальные пути, которые способствуют нейрогенезу (например, BDNF/АКТ1/mTORC1 путь). Мы предположили, что полифенолы должны обладать способностью снижать продукцию различных провоспалительных цитокинов, что, в свою очередь, может играть важную роль при патогенезе заболеваний нервной системы.

Для индуцирования нейровоспалительных процессов 3-месячные мыши получали инъекции липополисахаридов (ЛПС) в концентрации 0,375 мкг/кг. Часть мышей в течение трех недель потребляли следующие вещества из класса полифенолов: салидрозид (30 мг/кг/сутки), ресвератрол (20 мг/кг/сутки), куркумин 50 (мг/кг/сутки). Далее с помощью теста Морриса были оценены показатели пространственной и рабочей памяти у мышей. В процессе проведения так называемой «обратной» фазы обучения, наблюдались ухудшения в долговременной памяти у экспериментальной группы, получавшей только инъекции ЛПС, которая значительно дольше переключалась с одного вида ориентира на другой, в отличие от мышей, получавших вдобавок полифенольные вещества.

Во время проведения молекулярной части эксперимента мы выяснили, что потребление полифенолов снижало экспрессию генов некоторых провоспалительных цитокинов, таких как TNF, IL-1 β , IL-6, что частично может объяснить разницу между показателями когнитивных способностей у групп мышей, которые получали только инъекции ЛПС и групп, потреблявших полифенолы, оказывавшие защитное действие на основные отделы мозга, ответственные за формирование долговременной памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-74-00115).

ПРОДУКЦИЯ мРНК ОСНОВНЫХ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА СЕРТОНИНА У КРЫС ПРИ МАРГАНЕЦ-ИНДУЦИРОВАННОМ ИЗМЕНЕНИИ ПОВЕДЕНИЯ

Кудринская В.М.¹, Ивлева И.С.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

v.kudrinskaja2011@yandex.ru

Известно, что у лиц, подвергшихся избыточному поступлению марганца в организм, например сварщиков, развивается депрессивно-подобное состояние. Молекулярные механизмы данного процесса до сих пор не выявлены, однако, неоспоримо, что в основе развития депрессии лежит нарушение обмена серотонина. Целью данной работы было: определить продукцию мРНК основных ферментов метаболизма серотонина у крыс с учетом марганец-индуцированного изменения поведения.

Работа выполнена на взрослых самцах крыс Вистар, 220–250 г. Животные были разделены на две группы: первой группе интраназально вводили раствор $MnCl_2$ (1 мг/жив в объеме 20 мкл в день), а второй группе – 20 мкл физиологического раствора в течение 34 дней. Для оценки депрессивно-подобного поведения применялся тест «Принудительное плавание», который был проведен на 8-й и на 29-й дни эксперимента. Было показано, что у крыс, получавших $MnCl_2$, наблюдается снижение среднего времени активного плавания в 5 раз по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о нарушении в нейротрансмиссии серотонина. Оценку тревожности проводили с помощью теста «Открытое поле» на 33-й день эксперимента. Хроническое введение $MnCl_2$ приводит к уменьшению количества актов «груминг» в 1,8 раз, «заглядываний» в норки в 1,7 раз и количества стоек с упором в 1,7 раз по сравнению с контролем, что свидетельствует о повышенной тревожности у крыс. Депрессивно-подобное поведение может быть связано с нарушением активности ферментов, принимающих участие в метаболизме серотонина, например, ТРН-2 – фермент, участвующий в синтезе серотонина, и МАО-А – фермент, участвующий в метаболизме серотонина. Нами были измерены уровни мРНК МАО-А и ТРН-2 в клетках стриатума крыс. Оказалось, что хроническое воздействие $MnCl_2$ на лабораторных животных приводит к уменьшению уровней мРНК МАО-А в 2,3 раза и ТРН-2 в 2,2 раза в клетках стриатума по сравнению с контролем.

Таким образом, можно заключить, что хроническое интраназальное введение $MnCl_2$ приводит к снижению уровней мРНК ферментов метаболизма серотонина у крыс.

СЕНОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА HSP90 ПРИ ФИБРОЗЕ ЛЕГКИХ У МЫШЕЙ

Кузекова А.А.^{1,2}, Ерилина Д.А.^{2,3}, Гордеева А.Е.², Глушкова О.В.^{1,2,3}

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

³Государственный университет Дубна, Дубна, Россия

akkuzekova@mail.ru

В связи с ростом доли трудоспособного населения пожилого возраста, старение и развитие заболеваний, ассоциированных с возрастом, представляют собой социально-значимую проблему. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) – разрушительное возраст-ассоциированное заболевание, характеризующееся прогрессирующим замещением легочной паренхимы фиброзным рубцом, сопровождается накоплением стареющих (сенесцентных) клеток в легких пациента. Это приводит к паракринному старению соседних клеток, тканей и органов, способствуя старению организма в целом. Известно, что элиминация сенесцентных клеток с помощью сенолитиков приводит к снижению прогресса заболевания. Сейчас в качестве перспективных сенолитиков исследуются ингибиторы активности белка теплового шока 90 (HSP90). Целью настоящей работы было исследование сенолитического потенциала ингибитора HSP90 β – KUNB31 на мышцах линии C57BL/10, при лечении фиброза легких, индуцированного блеомицином (БЛФ).

Было показано, что интратрахеальное введение блеомицина (80мкг/мышь) вызывало развитие фиброза легких у мышей, что сопровождалось снижением массы тела, температуры и жизнеспособности животных. При этом в легких наблюдали образование фиброзных тканей, что коррелировало с накоплением сенесцентных клеток. Внутривентральное введение (180нМ/мышь) ингибитора KUNB31 способствовало улучшению физиологического состояния, продолжительности жизни животных и снижению содержания сенесцентных клеток и уровня фиброзообразования в легких мышей с БЛФ.

Таким образом, ингибитор HSP90 β – KUNB31 обладает высоким терапевтическим потенциалом в отношении фиброза легких у мышей. Применение данного ингибитора представляется перспективным в качестве сенолитического лекарственного препарата при ИЛФ и, вероятно, иных возраст-ассоциированных заболеваниях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00041.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОМАРКЕРОВ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ПРИЕМА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В МОДЕЛИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Кукушкина Е.С.¹, Майнстренко В.А.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

eskukushkina@mail.ru

Нейровоспаление – специфическая для нервной системы реакция, проявляющаяся в ответ на различные повреждения мозга, такие как травмы, токсические повреждения, гипоксия, инфекции. Существуют модели воспалительного процесса у экспериментальных животных, инициированные посредством введения разных веществ, например, липополисахарида (ЛПС). В связи с высокой распространенностью инфекционно-воспалительных заболеваний люди нередко занимаются самолечением, принимая антибактериальные препараты (АТБ). Известно, что общедоступные АТБ широкого спектра действия – ампициллин и метронидазол – приводят к нарушению баланса микрофлоры кишечника. Однако их роль в развитии нейровоспаления не рассматривалась.

Цель работы: изучение биомаркеров нейровоспаления (интерлейкин-1 β (IL-1 β), фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и маркер активации микроглии (IBA-1)) после курсового приема АТБ в модели эндотоксинемии.

Самцов крыс *Wistar* (n=40) случайным образом разделили на 4 группы по 10 голов в каждой. Первой группе интраперитонеально (и/п) вводили 1 мл 9% раствора NaCl, а второй – ЛПС в дозе 1 мг/кг. Третьей и четвертой группам в течение двух недель интрагастрально вводили смесь из АТБ (метронидазол в дозе 50 мг/кг животного и ампициллин в дозе 100 мг/кг). На 15 день третьей группе и/п вводили ЛПС в дозе 1 мг/кг. Через 2 месяца после начала эксперимента у животных брали стриатум и гиппокамп для анализа основных биомаркеров нейровоспаления методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени.

Результаты и выводы. В клетках гиппокампа после введения ЛПС во 2 группе обнаружили повышение экспрессии мРНК IL-1 β в 1,3 и 2 раза по сравнению с 1 и 4 группой соответственно. Наблюдали увеличение уровня мРНК IL-1 β в экспериментальной группе (ЛПС+АТБ) в 1,5 раза по сравнению с 3 группой. Отмечено повышение уровня мРНК TNF- α в группах с введенным ЛПС в 2 раза по сравнению с 4 группой. При этом во 2 группе с ЛПС происходит увеличение экспрессии мРНК IBA-1 по сравнению с группой с 9% NaCl. В клетках стриатума через 2 месяца после введения ЛПС во 2 группе обнаружено повышение уровня мРНК IL-1 β в 1,5 раза, а TNF- α в 1,3 раза по сравнению с 1 и 4 группами. В 3 группе обнаружено повышение уровней мРНК IL-1 β и TNF- α в 1,5 раза по сравнению с 1 и 4 группами. Достоверных отличий уровней мРНК IBA-1 не выявлено. Обнаруженное повышение уровня провоспалительных цитокинов в экспериментальной группе демонстрирует, что введение субсептической дозы ЛПС приводит к развитию нейровоспаления у крыс, тогда как использование АТБ на этот процесс не влияет.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ НАРУШЕНИЕМ ОБМЕНА ДОФАМИНА ПРИ ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

Куликова Е.Д.^{1,2}, Трактиров Д.С.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

kulikovaekaterina77@gmail.com

Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) — часто диагностируемое психоневрологическое расстройство, характеризующееся импульсивностью, невнимательностью и повышенной двигательной активностью. СДВГ страдают 8–12% детей и >4% взрослых. Этиология, лежащая в основе СДВГ разнообразна, и было выявлено множество возможных факторов риска развития СДВГ. Одним из таких факторов является повышенный окислительный стресс. Различные исследования демонстрируют изменения уровней маркеров окислительного стресса, таких как глутатион-S-трансфераза (GST), глутатион-редуктаза (GR), каталаза (CAT), при СДВГ. Однако однозначных данных, подтверждающих, что для пациентов с СДВГ характерен повышенный окислительный стресс, нет. В связи с этим, целью данной работы был анализ динамики уровней активности GST, GR и CAT у крыс с нокаутом гена транспортера дофамина (dopamine transporter knock out, DAT-KO).

Исследование проводилось на крысятах DAT-WT (дикий тип, n = 14) и DAT-KO (полный нокаут гена DAT, n = 10). Образцы крови у крысят были отобраны на 1, 3 и 5 неделях из хвостовой вены. Плазму и эритроциты крови отделяли 15-минутным центрифугированием при 2000 g. Активность CAT измеряли в плазме крови, а GST и GR – в эритроцитах.

Было обнаружено, что активность GST в эритроцитах крыс DAT-KO была значительно выше по сравнению с животными WT во все временные точки постнатального развития: 1 неделя (p = 0,047), 3 неделя (p = 0,048), 5 неделя (p = 0,0136). Активность GR в эритроцитах крыс DAT-KO в возрасте 3 и 5 недель была снижена по сравнению с животными WT (p = 0,0003). Активность CAT в плазме крови крысят DAT-KO была значительно ниже по сравнению с группой WT во все изученные временные точки постнатального развития: 1 неделя (p < 0,0001), 3 неделя (p = 0,0001) и 5 неделя (p = 0,0003).

Работа выполнена при поддержке РНФ, проект № 22-25-00124.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОКРАШИВАНИЯ И ДЕТЕКЦИИ ВАКЦИННЫХ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА

Ласьков И.Д.^{1,2}, Нехаева Т.Л.¹, Тындык М.Л.¹, Блохина М.Л.¹, Емельянова Н.В.¹,
Юрова М.Н.¹, Федорос Е.И.¹

¹НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

2001lid@gmail.com

Оценка биораспределения противоопухолевого клеточного препарата на основе вакцинных дендритных клеток (ДК) является одной из важных составляющих доклинических исследований и позволяет изучать присутствие введенных клеток в органах и тканях организма животного. Разработку протокола окрашивания вакцинных ДК (человек, мышь BALB/c) проводили с использованием прижизненных флуоресцентных красителей индоцианина зеленого (ICG), анализируемого с помощью системы визуализации IVIS Lumina LT series III (PerkinElmer, USA) и сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) с последующей детекцией методом проточной цитометрии (FACSCanto II, BD Bioscience). Изучение цитотоксичности и способности флуоресцентных красителей оставаться в окрашенных *in vitro* ДК в концентрации, достаточной для детектирования проводили в течение 96 час. Показано, что флуоресцентный краситель CFSE (2,5 мкМоль/мл) более приемлем для исследования кинетики и миграции ДК-CFSE⁺, чем ICG (0,25 мг/мл), поскольку стабилен, лучше удерживается внутри клетки и более 90% меченных ДК сохраняют жизнеспособность в течение всего периода наблюдения. Оценку распределения ДК в организме животных (мышь линии BALB/c, n=43, самки) проводили после однократного внутрикожного введения ДК-CFSE⁺. Локализацию в дренирующих лимфатических узлах определяли по наличию ДК-CFSE⁺ методом проточной цитометрии через 16, 24, 48, 72 и 96 час. Для визуализации животных эвтаназировали с извлечением подвздошных, подмышечных и шейных лимфатических узлов. Установлено, что количество ДК-CFSE⁺ в дренирующих лимфатических узлах через 16 час составляет 5,3%, увеличивается к 48 час до 13,3% (p=0,028 vs 16 час), достигает максимума к 72 час 15,4% (p=0,003 vs 16 час) и снижается к 96 часам до 8,85% (p=0,086 vs 72 час).

Исследование поддержано грантом РНФ № 20-75-00095 и одобрено Комитетом по Этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Протокол № 20 от 18.08.2022).

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОМАРКЕРОВ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ПРИЁМА ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДА (ДЕКСАМЕТАЗОН) В МОДЕЛИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Лебедева Е.Я.¹, Майстренко В.А.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

lebedeva.elen@pharminnotech.com

Введение. Нейровоспаление это специфическая реакция нервной системы, обусловленная активацией микроглии. Эффективность купирования ГКС периферических воспалительных процессов хорошо изучена. Церебральные эффекты глюкокортикостероидов практически не исследованы. **Ход эксперимента.** Экспериментальных животных (самцов крыс Wistar) взвешивали и методом блочной рандомизации разделяли по 10 голов на 4 группы. Первой группе интраперитонеально (и/п) вводили физиологический раствор 1 мл, второй группе и/п вводили ЛПС в дозе 1 мг/кг животного, третьей группе и/п вводили Дексаметазон в дозе 2 мг/кг и четвертой группе за 2 часа до инъекции ЛПС в дозе 1 мг/кг вводили Дексаметазон в дозе 2 мг/кг. На протяжении первых 4 часов эксперимента каждые 30 минут и по истечении 24 часов измеряли глубокую температуру тела крыс для построения температурной кривой. Через 10 дней после начала эксперимента животных декапитировали, брали стриатум и гиппокамп с целью проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), предварительно выделив тотальную мРНК.

Результаты и выводы. В клетках стриатума в ответ на введение пресептической дозы ЛПС наблюдалось увеличение уровня экспрессии мРНК IL-1 β в 2 раза в группе с ЛПС по сравнению с контролем и дексаметазоном. Так же в клетках стриатума в группе с ЛПС наблюдали увеличение уровня экспрессии мРНК TNF α в 2 раза по сравнению с контролем и дексаметазоном. При этом в группе Дексаметазон + ЛПС было обнаружено повышение уровня мРНК TNF α в 1,5 раза в сравнении с контрольной группой. В отношении изменения уровня мРНК iNOS в стриатуме в группе с введением ЛПС наблюдали рост показателя в 3 раза по сравнению с контролем и в 2 раза по сравнению с дексаметазоном. Выявлено, что и/п введение дексаметазона в модели экспериментальной эндотоксинемии препятствует развитию периферического воспаления, однако достоверно не снижает уровни экспрессии генов провоспалительных показателей в стриатуме крыс на 10 день после начала эксперимента. Подавления воспаления в ЦНС не происходит. При этом и/п введение дексаметазона не усиливает выраженность воспаления в ЦНС при совместном введении с ЛПС.

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ В КОСТНОМ МОЗГЕ КРЫС

Лизоркина К.И., Теплова П.О., Афанасьев В.Н., Захарова Н.М.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный
центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

lizorkina_ksenii@mail.ru

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений регенеративной медицины в настоящее время является клеточная терапия с использованием трансплантации стволовых клеток. Однако, существует проблема низкой выживаемости привитых клеток из-за микроокружения с пониженным содержанием кислорода, что ограничивает применение этого метода. Ранее было показано, что увеличить выживаемость клеток и повлиять на клеточный цикл *in vitro* способна гипотермия. Но нет данных, каким образом может измениться клеточный цикл в костном мозге и выживаемость клеток при последующей трансплантации после охлаждения целого организма.

Цель данного исследования заключалась в выявлении особенностей влияния гипотермии на фазы клеточного цикла в костном мозге крыс при их охлаждении на 20°C – 22°C.

Материалы и методы. Для исследования использовали самцов крыс линии *Wistar* весом от 200 до 290 г. Крыс выдерживали в герметичной камере объемом 5 л при температуре среды 7°C в течение 3 – 4 ч, что в условиях нарастающей в процессе дыхания гипоксии/гиперкапнии вводило животных в состояние гипотермии с понижением температуры тела до 18° – 20°C. Забор костного мозга осуществляли из бедренной кости у контрольных крыс (n=3), у крыс в гипотермном состоянии (n=4) и у крыс через сутки после охлаждения (n=4). Клетки фиксировали в спирте и затем окрашивали Hoechst 33342. Анализ фаз клеточного цикла проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии (Cytoflex, Beckman Coulter, США). Манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с рекомендациями, установленными Директивой Европейского Совета 2010/63/EU.

Результаты. Влияния охлаждения на G0+G1 фазы клеточного цикла костного мозга не обнаружено. При этом в S-фазе наблюдается увеличение показателей в 1.5 раза в состоянии гипотермии, сохраняющееся через сутки после процедуры охлаждения, а значения в G2+M фазе в эти периоды по сравнению с показателями контроля снижаются.

Заключение. Воздействие гипотермии не оказывает влияния на количество клеток, которые находятся в фазах G0+G1, то есть в фазе подготовки к митозу и фазе «покоя». Такая устойчивость клеток может быть объяснена тем, что в это время клетка достигает своих максимальных размеров и непродолжительное воздействие гипотермии не запускает каскад реакций, необходимый для торможения клеточного цикла в этих фазах. Однако, даже относительно непродолжительное снижение температуры тела оказывает влияние на S-фазу клеточного цикла во время и в течение суток после воздействия. Можно предположить, что на фоне существенного (более чем на 20°C) охлаждения появляется необходимость во временной остановке фазы клеточного цикла для предотвращения возможных ошибок в ходе репликации ДНК при таком экстремальном воздействии. Снижение количества клеток в G2+M фазах может быть также связано с температурным воздействием и снижением скорости синтеза белков, необходимых для митоза. Мы предполагаем, что влияние гипотермии *in vivo* способно увеличить выживаемость клеток при дальнейшей трансплантации, благодаря торможению скорости митоза и остановке клеточного цикла для уменьшения ошибок на стадии удвоения ДНК.

РАННИЕ ДИСФУНКЦИИ АСТРОЦИТОВ В НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНОЙ СЕТИ У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Матвеева М.В., Федулina А.А., Мальцева К.Е., Бельтюкова А.В., Лебедева А.В.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.
Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

m.matveeva288@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) является частым нейродегенеративным заболеванием у людей пожилого возраста, начинающееся задолго до появления клинических симптомов. Было предложено множество гипотез о причинах возникновения и механизмах развития БА, но точные патофизиологические процессы лежащие в основе развития заболевания до сих пор не известны.

До недавнего времени основной объектом исследования, ассоциированного с БА патогенеза были нейронные сети. Возможный астроцитарный вклад в развитие болезни в значительной степени игнорировался. Однако, астроциты являются неотъемлемой частью мозга, а реактивность астроцитов является ранним признаком развития заболевания, потенциально обеспечивая перспективную мишень для доклинической диагностики и лечения [1]. В животных моделях БА астроциты подвергаются дегенерации и атрофии на ранних стадиях патологического процесса, что, возможно, может изменить гомеостатический резерв мозга и способствовать раннему когнитивному дефициту [2]. На ранних стадиях прогрессирования болезни БА происходят метаболические изменения в мозге, в основе которых лежат нарушения в поставке глюкозы и других питательных веществ от астроцитов к нейронам [3].

В связи с этим целью исследования является изучение функционирования нейрон-астроцитарной сети в гиппокампе мышей с моделью болезни Альцгеймера в до симптоматическом периоде. Все эксперименты проводились на переживающих срезах гиппокампа генномодифицированной линии мышей 5xFAD, имеющей мутации генов, характерные для болезни Альцгеймера. Для проведения экспериментов были взяты половозрелые самцы возрастом 1-1,5 месяца.

В ходе работы была проведена оценка когнитивно-мнестических способностей не выявившая различий в испытуемых группах. В то время как при исследовании функциональной кальциевой активности астроцитов было показано, что у мышей 5xFAD наблюдалось увеличение частоты и количества ответов, а также количественное увеличение астроцитов (астроглиозис). Это указывает на то, что астроциты претерпевают изменения на ранних стадиях развития БА, до проявления выраженных когнитивных дисфункций. Кроме того, было выявлено снижение уровня долговременной синаптической потенциации у мышей 5xFAD относительно контрольной группы. Следует отметить, что обратный захват нейромедиаторов астроцитами, который может быть нарушен у животных линии 5xFAD, играет важную роль в генерации и поддержании долговременной пластичности. Таким образом, данная работа показывает наличие ранних нарушений нейрон-астроцитарных взаимодействий на ранних этапах развития болезни Альцгеймера.

Литература.

1. González-Reyes R. E. et al. Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective //Frontiers in molecular neuroscience. – 2017. – Т. 10. – С. 427, doi: 10.3389/fnmol.2017.
2. Li K. et al. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases //Aging and disease. – 2019. – Т. 10. – №. 3. – С. 664, doi: 10.14336/AD.2018.0720.
3. Butterfield D. A., Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease //Nature Reviews Neuroscience. – 2019. – Т. 20. – №. 3. – С. 148-160, doi: 10.1038/s41583-019-0132-6.

ОЦЕНКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ, ПОЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС

Медведева В.П.^{1,2}, Мосенцов А.А.¹, Хмиль Н.В.^{1,2}, Успенко Н.И.^{1,2}, Полякова Т.В.¹,
Степанов С.В.¹, Мионов В.В.², Хундерякова Н.В.^{1,2}

¹Пушинский государственный естественно-научный институт Пушино, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН Пушино, Россия

vasilisa.medv@mail.ru

Цель. Целью работы было исследовать активности ключевых ферментов энергетики лимфоцитов: митохондрий – активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), и гликолиза – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), уровень ПОЛ в сыворотке и в мозге, провести поведенческие тесты у животных при экспериментальной болезни Паркинсона (БП), индуцированной введением Ротенона.

Материалы и методы. В опыте использовали крыс-самцов линии Вистар. Для моделирования экспериментальной БП у крыс использовали раствор Ротенона (SIGMA) дозой 1,7 мг/кг веса тела животного, который вводили подкожно на протяжении 28 дней, по схеме 2 дня введение, 2 дня перерыв; Ротенон растворяли в смеси ДМСО + Интролипид 20%. Ротенон является ингибитором клеточного дыхания, блокирует перенос электрона с железосерного кластера в комплексе I на убихинон [Мосенцов А.А., 2020]. Исследование активности СДГ (биомаркер аэробного дыхания митохондрий) и ЛДГ (биомаркер анаэробного дыхания – гликолиза) проводили ЦБХ методом в иммобилизованных лимфоцитах крови на мазке [Кондрашова М.Н., 2008]. Измерение активностей СДГ и ЛДГ проводилось в цельной крови, взятой путем декапитации животных. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в митохондриях мозга, а также сыворотке крови крыс определяли спектрофотометрическим методом (Hiroschi Ohkawa) по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при 535 нм. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 4 и Excel 6.0 и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Статистические различия между данными определялись с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по критерию Стьюдента-Ньюмена-Келса. Различия между средними значениями считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Моделирование БП у крыс при введении Ротенона сопровождалось достоверным увеличением активности СДГ в лимфоцитах крови в два раза, так среднее значение в группе контроля (n=5) $0,447 \pm 0,02$, в группе БП – $0,966 \pm 0,02$. Такое резкое увеличение аэробного дыхания митохондрий у больных крыс может означать, что при БП появляется состояние гиперактивации, которое выражается также физиологическими изменениями (мышечный тремор в конечностях) поведенческих реакций в тесте «открытое поле». Измерение анаэробного дыхания по активности ЛДГ в лимфоцитах сопровождалось увеличением в меньшей степени, на 45%, среднее значение в группе контроля (n=5) $1,918 \pm 0,07$, в группе БП $2,792 \pm 0,02$. Нами обнаружено развитие окислительного стресса при БП, так уровень МДА в сыворотке крови почти в 2 раза выше у крыс с БП (значение $7,68$ ммоль/л), чем в контроле ($4,4$ ммоль/л * $P \leq 0,05$). В результате корреляционного анализа было установлено, что в исследованных группах крыс БП имеется тесная корреляционная связь активности СДГ в лимфоцитах с ПОЛ в сыворотке с высоким коэффициентом корреляции $r=0,79$. Полученные в ходе проведенного нами исследования данные, свидетельствуют о развитии окислительного стресса и нарушении функций митохондрий, что подтверждает их известную ключевую роль в патогенезе БП.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-25-00441.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РОСТ ВОЛОС НА МЫШАХ C57BL/6

Михайлов Е.С.¹, Мурашев А.Н.², Бондаренко Д.А.², Аршинцева Е.В.³, Далевич Р.А.¹,
Пушкин С.Ю.³, Пушкина К.В.⁴, Салыкин В.В.⁵

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

³ООО Эмульсии медицинские, Серпухов, Россия

⁴ООО Жюнесс, Одинцово, Россия

⁵ООО ПФОрганик, Кубинка, Россия

mikhaylov@bibch.ru

Объект исследования: тестируемый препарат – Perfleor + Дельтафирокс (5%).

Предмет исследования: влияние препарата на рост волос у мышей C57BL/6.

Цель исследования: изучить эффективность препарата с перфторорганической (ПФО) эмульсией Perfleor + Дельтафирокс (5 %), как стимулирующего рост волос при кожных аппликациях мышам.

Описательная часть. Тестируемый препарат и препарат сравнения (Minoxidil 5%) наносились животным в виде аппликаций курсом 21 день. Контрольным животным наносился физиологический раствор в том же объеме.

За день до начала аппликаций препаратов мышам линии C57BL/6 (52 дня со дня рождения) удалялся волосяной покров под анестезией в области спины по средствам сбривания шерсти и удаления подшерстка депиляционным кремом. После паузы 24 часа

животным, в соответствии с группой, производились аппликации веществ в равных количествах вместе с обработкой кожи мезороллером. Отрастание шерсти фиксировалось с помощью цифровой фотофиксации на 1, 7, 14 и 21 дни.

Заключение. Динамика положительного влияния препарата достигает максимума в конце третьей недели применения. Имеющиеся вариации погрешности (коэффициента \pm) обусловлены меньшим числом подопытных мышей (животное № 15 погибло на 1 день эксперимента) и, как следствие, большим разбросом статистических отклонений. Учитывая небольшую концентрацию препарата, результаты его применения удовлетворяют условиям проведения исследования и сопоставимы с применением Minoxidil 5%.

1-ая неделя – рост одинаковый.

2-ая неделя – рост в группе Minoxidil в 2 раза быстрее.

3-я неделя – рост в группе Perfleor + Дельтафирокс в 4 раза быстрее.

Выводы. Максимальный эффект в группе Minoxidil наблюдается во 2-ой неделе, после эффект снижается. Напротив, в группе Perfleor + Дельтафирокс эффект и во 2-ую и 3-ю недели постоянен.

При увеличении концентрации ПФО-эмульсии в препарате Perfleor + Дельтафирокс, при его дальнейшем применении, можно сделать вывод о положительном влиянии препарата на усиление роста волосяного покрова у мышей.

АНАЛИЗ АЛЬТЕРНАНСОВ СОКРАЩЕНИЯ САРКОМЕРОВ В ОДИНОЧНЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ ПРЕДСЕРДИЙ И ЖЕЛУДОЧКОВ ПРИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

Михрякова П.П.¹, Бутова К.А.², Мячина Т.А.², Симонова Р.А.², Хохлова А.Д.^{1,2}

¹Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, Россия

²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

x.butova@gmail.com

Фибрилляция предсердий (ФП) – наиболее распространенная форма сердечной аритмии, характеризующаяся неупорядоченным распространением волны электрического возбуждения по предсердиям и их нескоординированным сокращением. Нарушение сократительной функции предсердий приводит к дисфункции желудочков и развитию сердечной недостаточности. Прогрессирование ФП связано с возникновением альтернансов – чередование сократительных циклов с отличными от стационарных значений параметрами электрических (альтернансы потенциала действия) и механических (альтернансы сокращения) характеристик миокарда. Механические альтернансы изучены недостаточно. Особый интерес представляет региональная оценка частоты возникновения и параметров механических альтернансов при ФП не только в предсердиях, но и в желудочках, что позволит выявить наиболее уязвимый к нарушениям ритма участок миокарда.

Цель исследования: анализ альтернансов сокращения саркомеров в одиночных кардиомиоцитах левого (ЛП) и правого предсердий (ПП), а также левого (ЛЖ) и правого желудочков (ПЖ) при ФП.

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар (возраст 10 недель) в соответствии с Директивой 2010/63/EU. Инициацию пароксизмальной ФП выполняли внутривенным введением раствора ацетилхолин хлорид- CaCl_2 (60 мкг/мл АСhCl, 10 мг/мл CaCl_2) в дозировке 1,3 мл/кг в течение 7 дней. Наличие пароксизмов ФП выявляли при регистрации ЭКГ (ECG300G-VET, Китай). Изоляция одиночных кардиомиоцитов была реализована методом перфузии сердца по Лангендорфу с авторскими модификациями (*Butova et al.*, MethodsX, 2021). Измерения укорочения саркомеров в одиночных кардиомиоцитах при их механически ненагруженных сокращениях выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса MCSYS-02 (IonOptix, США) при 30°C и 1 Гц.

Анализ альтернансов проводили при помощи ПО IonWizard (IonOptix, США). Наличие альтернансов в исходной записи принималось при выявлении чередования минимальных (MIN) и максимальных (MAX) отклонений амплитуды укорочения саркомеров длительностью более 5 сократительных циклов от стационарных значений (рассчитанных как среднее значение параметров до и после альтернанса). В качестве критерия механического альтернанса выбиралось отклонение амплитуды укорочения более 10% от стационарных значений.

В исследованном массиве клеток ($n=70$, $N=8$) встречаемость механических альтернансов в кардиомиоцитах предсердий составила 75% для ПП и 83% для ЛП, тогда как в миоцитах желудочков – 37% для ПЖ и 43% для ЛЖ. Медиана MIN отклонения амплитуды укорочения саркомера в альтернансе от стационарных значений составляла 15% в ЛП и 7% в ПП. Медиана MAX отклонений амплитуды укорочения саркомера в альтернансе от стационарных значений достигала 17% в ЛП и на 9% в ПП. Медианы MAX отклонений амплитуды в ЛЖ и ПЖ составили 12% и 13%, медианы MIN 11% и 12% соответственно. Анализ альтернансов механической функции саркомеров позволил предположить большую уязвимость сократительной функции к пароксизмам ФП у кардиомиоцитов левых отделов сердца. При этом отклонения амплитуды укорочения саркомеров в альтернансе от стационарных значений по величине более выражены в кардиомиоцитах предсердий. Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН при поддержке гранта РФФ № 22-75-10134.

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОЙ ТЕМНОТЫ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У КРЫС

Морозов А.В.¹, Хижкин Е.А.^{1,2}, Виноградова И.А.²

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ Карельский научный центр
РАН, Петрозаводск, Россия

²Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

artem.morozow@yandex.ru

Световой режим в значительной степени оказывает влияние на работу большинства физиологических систем у человека и животных. Однако влияние на организм длительного воздействия темноты, наблюдаемой осенью и зимой в Арктической зоне России, до сих пор

недостаточно изучено. Главную роль в адаптации к изменению фотопериодических условий окружающей среды играет гормон пинеальной железы мелатонин. В желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) вырабатывается в 400 раз больше мелатонина, чем в эпифизе, но эта секреция не регулируется фотопериодом. Нарушение суточной цикличности синтеза мелатонина, способно влиять на деятельность ЖКТ. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния постоянной темноты на активность пищеварительных ферментов у крыс. Исследование выполнено на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Эксперимент проводили на самцах крыс Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария. В течение 14 дней животных синхронизировали с циклом свет/темнота 12:12 (LD). После этого крыс разделили на две группы: часть оставили в условиях LD (контроль), а других переместили в постоянную темноту (DD). Через 14 дней в возрасте 7 месяцев крыс декапитировали и отбирали образцы тканей поджелудочной железы и слизистой оболочки тонкого кишечника для последующего анализа. В результате проведенного исследования нами установлено, что у крыс в DD режиме по сравнению с контрольными животными, как в панкреатической железе, так и в тонком кишечнике было выявлено увеличение активности протеаз и амилазы, а также снижение активности липазы. По нашему мнению, эффекты воздействия световой депривации на ферментативный компонент пищеварительной системы у крыс, вероятно, связаны с активацией энтеропанкреатического рефлекса и увеличением секреции гормона холецистокинина, обусловленных повышением в организме уровня эпифизарного мелатонина.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № FMEN-2022-0003).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИННЫМИ ЛИГАНДАМИ С ГЕМОГЛОБИНОМ И ГЛУТАТИОНОМ

Новикова В.О.¹, Покидова О.В.¹, Куликов А.В.¹, Санина Н.А.^{1,2,3}

¹Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного областного университета, Мытищи, Россия

Veronika@icp.ac.ru

Нитрозильный комплекс железа (НКЖ) состава $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5))_2(\text{NO})_2]^+\text{Cl}^- \cdot [\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5))\text{Cl}(\text{NO})_2]^0$ (комплекс 1) является перспективным донором монооксида азота (NO) – сигнальной молекулы, которая обладает широким спектром биологически важных эффектов, а также вызывает ряд патологических процессов.

Восстановленный глутатион (GSH), а также дезокси- и оксигемоглобин (Hb и HbO₂) могут быть вовлечены в процессы биотрансформации нитрозильных комплексов. NO, выделившийся при диссоциации НКЖ, реагирует с HbO₂ с образованием нитрат-иона и метгемоглобина (metHb): $\text{HbO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{metHb} + \text{NO}_3^-$. Hb с NO образует в растворе нитрозилгемоглобин: $\text{Hb} + \text{NO} \leftrightarrow \text{HbNO}$. GSH способен вступать во взаимодействие с комплексами и его продуктами распада с образованием S-нитрозотиолов, также возможна замена исходных тиолигандов НКЖ на глутатионовые лиганды.

Показано, что при увеличении концентрации гемоглобина наблюдается уменьшение скорости NO-донирования, что свидетельствует о стабилизации комплекса 1 на поверхности белка: генерация NO из белок-связанного комплекса происходит медленнее. При этом не образуется высокомолекулярный белоксвязанный комплекс. Анизотропия g-фактора, наблюдаемая в спектрах ЭПР, указывает на сильное торможение вращения парамагнитных фрагментов комплекса 1 за счет их связывания с молекулой белка. Таким образом, результаты ЭПР-спектроскопии подтверждают данные УФ-спектроскопии о стабилизации комплекса 1 в системе с белком.

В УФ-спектрах реакционной смеси комплекса 1 с GSH наблюдается появление новых полос в области 312 и 363 нм, что свидетельствует об образовании нового глутатионового биядерного комплекса. Изменение оптической плотности, наблюдаемое за 4 часа эксперимента в смеси с GSH, указывает на то, что образующийся комплекс постепенно распадается. Используя реакцию Грисса для определения концентрации нитритов, которые накапливаются как продукты взаимодействия NO с кислородом в аэробных условиях, было определено, что полученное соединение выделяет NO в присутствии GSH почти в сто раз медленнее, чем исходный комплекс 1 без белка.

Таким образом, установлено, что при распаде исследуемого комплекса важную роль играет присутствие биологических субстратов. При включении гемоглобина и глутатиона в биотрансформацию НКЖ они будут влиять на процессы распада комплекса 1, в том числе на NO-донорную активность.

Синтез комплекса выполнен по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6.

Исследование трансформации комплекса в биологических системах выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-00316).

СВОЙСТВА ЭНДОГЕННЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ АНОКТАМИН-6 И МЕХАНИЗМ ИХ АКТИВАЦИИ В НЕК293

**Номеровская М.А., Григорьева Е.Р., Решетников Д.С., Шалыгин А.В.,
Колесников Д.О., Казначеева Е.В.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

lukjanenok_maria@mail.ru

Предметом нашего исследования стали кальций-активируемые хлорные каналы семейства аноктаминов – аноктамин-6 (ANO6). Этот ионный канал имеет две поры и обладает скрамблзной активностью, участвуя в пассивном переносе фосфатидилсерина со внутренней стороны плазматической мембраны на наружную. В последние годы интерес к данному белку сильно возрос, что связано, в частности, с его ролью в образовании синцития легочной ткани при тяжелом течении Covid-19. Большинство установленных функций ANO6 такие как: слияние клеток при формировании трофобласта, регуляция активации лимфоцитов, участие в коагуляции крови связаны с его скрамблзной активностью. Процесс же переноса хлора важен для минерализации костной ткани и секреции экзокринных желез.

Несмотря на высокий интерес научного сообщества к ANO6, сведения о некоторых его свойствах, в том числе о селективности и пути активации, противоречивы. В одних работах ANO6 описывается как неселективный катионный канал, в других – как анионный, к тому же, предполагается изменение его селективности в зависимости от концентрации внутриклеточного кальция. В недавних работах была установлена колокализация аноктаминов и депо-управляемых кальциевых каналов, однако их функциональное сопряжение изучено недостаточно. Уточнение этих вопросов и стало целью нашего исследования. Используя метод локальной фиксации потенциала, мы регистрировали активность одиночных эндогенных каналов ANO6 в клетках HEK293 с нокдауном по гену ANO6 и/или с нарушением депо-управляемого входа кальция.

В ходе исследования нами были описаны электрофизиологические свойства эндогенных одиночных каналов ANO6 в HEK293, установлено наличие функциональной взаимосвязи ANO6 с депо-управляемыми кальциевыми каналами, описано изменение селективности ANO6 в присутствии разных концентраций кальция, а также были исследованы эффекты, оказываемые быстрым кальциевым хелатором ВАРТА.

Работа поддержана грантом РФФ-22-24-00761.

ВЫЯВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОДЕМЕНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛИБЕНКЛАМИДА

Обухова Д.А.^{1,2}, Тютюнник Т.В.², Зубов А.С.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

obuhowadaria@gmail.com

Глибенкламид (ГД) – давно используется в клинической практике как сахароснижающий препарат, однако в последнее время показано его плеiotропное действие на мозг. Согласно классическим представлениям, мишенью действия ГД являются КАТФ-каналы. ГД вызывает закрытие КАТФ-каналов, которые являются октамерами, которые состоят из 4-х рецепторов к сульфонилмочевине (белок SUR) и специфического белка Kir 6.x. Субъединица SUR1 может взаимодействовать с каналами TRPM4 (transient receptor potential channel melastatin) – кальций-активируемыми неспецифическими катионными каналами, активация которых – неотъемлемый этап развития воспалительного процесса в ЦНС, который может стать причиной развития когнитивного снижения вне зависимости от уровня сахара в крови. Эффект препарата зависит от дозы и проявляется как в условиях гипергликемии, так и при нормальном или сниженном уровне глюкозы.

Именно поэтому целью данной работы было выявление механизмов нейропротективного, в частности, противодементного действия глибенкламида при нормогликемии. В предварительных экспериментах было показано, что наибольший прокогнитивный эффект достигается при хроническом введении ГД в дозе 50 мкг/кг, нами была использована исключительно эта доза.

Материалы и методы: 30 самцов крыс Вистар методом блочной рандомизации разделили на две группы, группа 1 (Контроль) получала внутривентриальную инъекцию физиологического раствора раз в день 30 дней, а группа 2 (ГД) – внутривентриально ГД в дозе 50 мкг/кг, ежедневно 30 дней. По окончании введения животных декапитировали, извлекали гиппокамп и стриатум, и, используя RT-PCR с обратной транскрипцией, анализировали содержание мРНК SUR1, SUR2A, SUR2B, Kir6.1 и Kir6.2, а также TRPM4, ABCA1 и транспортера дофамина DAT. Данные представляли как среднее \pm ошибка среднего; для статистической обработки данных использовали t-тест, проверку на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Было установлено, что хроническое введение ГД приводит к снижению содержания мРНК DAT в клетках гиппокампа крыс в два раза ($p=0,021$). Также в клетках гиппокампа крыс экспериментальной группы в 2,5 раза ($p=0,031$) и мРНК Sur2b в 1,7 раза ($p=0,033$). Однако введение ГД не влияло на содержание мРНК ABCA1, Kir6.1, Kir6.2, SUR1 и SUR2A в клетках гиппокампа.

При хроническом введении ГД наблюдалось снижение уровня мРНК DAT в клетках стриатума крыс в полтора раза ($p=0,019$). Однако, введение ГД не влияло на содержание мРНК ABCA1, Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2A, TRPM4 и Sur2b.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что хроническое внутривентриальное введение глибенкламида вызывает повышение содержания мРНК SUR2b и мРНК TRPM4 в клетках гиппокампа крыс.

КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И СООТНОШЕНИЕ ПОДКЛАССОВ IGG1–IGG4 СУБФРАКЦИЙ IGG ПЛАЗМЫ КРОВИ ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ SPUTNIK V ДОНОРОВ

Онвумере М.К.¹, Толмачева А.С.², Тимофеева А.М.², Седых С.Е.^{1,2}, Невинский Г.А.^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

m.onvumere@g.nsu.ru

Повышение уровня активированных кислородных метаболитов (АКМ) связывают с повреждением тканей, тромбозом, дисфункцией эритроцитов и другими патофизиологическими процессами, наблюдаемыми при COVID-19. Наряду с каноническими ферментами антиоксидантной системы, в регуляции АКМ могут участвовать антитела с каталазной активностью, расщепляющие пероксид водорода, однако на данный момент их роль в патогенезе COVID-19 недостаточно изучена.

В работе использованы образцы плазмы крови четырех групп доноров: переболевшие COVID-19 ($n=28$); вакцинированные Sputnik V ($n=26$); вакцинированные Sputnik V после перенесенного COVID-19 ($n=13$); не переболевшие и не вакцинированные ($n=43$). Индивидуальные препараты IgG получены аффинной хроматографией на Protein G сефарозе, субфракции кк-IgG, $\lambda\lambda$ -IgG и $\kappa\lambda$ -IgG выделены из препаратов каждой группы аффинной

хроматографией на колонках KappaSelect и LambdaSelect. Соотношение подклассов IgG1–IgG4 для субфракций κκ-IgG, λλ-IgG и κλ-IgG определено иммуноферментным анализом. Значения кажущихся k_{cat} , характеризующие каталазную активность, определены спектрофотометрически по разложению пероксида водорода. Принадлежность каталазной активности антителам подтверждена на основании выполнения общепринятых критериев, таких как электрофоретическая гомогенность препаратов IgG и гель-фильтрация в условиях «кислого шока».

Все проанализированные препараты IgG обладают каталазной активностью. Медианные значения кажущихся k_{cat} для исследуемых групп доноров составляют (мин^{-1}): переболевшие COVID-19 – $1,7 \times 10^3$, вакцинированные – $1,2 \times 10^3$, непереболевшие – $0,9 \times 10^3$, переболевшие и вакцинированные – $0,8 \times 10^3$. Средние величины кажущихся k_{cat} для κκ-IgG исследуемых групп составляют (мин^{-1}): переболевшие – $0,7 \times 10^3$, вакцинированные – $0,4 \times 10^3$, переболевшие и вакцинированные – $0,2 \times 10^3$, непереболевшие – $0,2 \times 10^3$. Для λλ-IgG наблюдалось иное соотношение k_{cat} : непереболевшие – $0,5 \times 10^3$, вакцинированные – $0,5 \times 10^3$, переболевшие – $0,2 \times 10^3$, переболевшие и вакцинированные – $0,2 \times 10^3$. Величины кажущихся k_{cat} для κλ-IgG близки к нулю.

В субфракциях κκ-IgG и λλ-IgG всех исследуемых групп значительно преобладают IgG1 – процентное содержание подклассов IgG убывает в порядке: IgG1 (70,0–84,6 % от всех IgG), IgG2 (8,0–19,0 %), IgG3 (3,3–5,7 %), IgG4 (1,1–2,7 %). Для κλ-IgG наблюдается преобладание IgG1 (47,5–63,6 %) и повышенное содержание IgG2 (21,5–39,0 %), при этом для вакцинированных после COVID-19 и непереболевших доноров содержание IgG4 (9,7 % и 10,9 % соотв.) превышает IgG3 (4,8 % и 7,5 % соотв.).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что каталазная активность IgG крови переболевших COVID-19 и вакцинированных Sputnik V доноров может зависеть от соотношения антител с κκ-, λλ- и κλ-легкими цепями, а также от содержания подклассов антител.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-75-10105.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА В СУБТАЛАМИЧЕСКОМ ЯДРЕ У ПАЦИЕНТОВ С ВЫРАЖЕННОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ АСИММЕТРИЕЙ

Павловский Ф.Н.¹, Томский А.А.², Гамалея А.А.², Белова Е.М.¹, Седов А.С.¹

¹ФИЦ химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

²Центр нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко, Москва, Россия

pnrav@mail.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – распространённое заболевание, поиску биологических маркёров которого посвящено большое количество работ. Существуют различные модели, предлагающие считать таковыми различные паттерны активности субталамического ядра (СТЯ), например, общую гиперактивность его нейронов и увеличение мощности осцилляций в бета-диапазоне (13-30 Гц). Ни один из описанных на сегодняшний день маркёров, однако, не является однозначным. Существенным ограничением исследований на людях в этой области является отсутствие надёжной контрольной группы.

В нашей работе мы исследуем особенности активности субталамических ядер, принадлежащих разным полушариям одного и того же человека. Мы анализируем данные, полученные на пациентах с асимметричным проявлением БП, т.е. с неодинаковой выраженностью брадикинезии, ригидности и тремора вдоль вертикальной оси тела. Степень выраженности симптомов оценивал невролог по шкале UPDRS. Если разница между сторонами тела по каждому симптому превышала 25%, такого пациента включали в исследование. Таким образом, одно СТЯ у каждого пациента соответствовало стороне с более выраженными симптомами («аффектное» ядро), а второе («неаффектное» ядро) выступало условным контролем.

В исследование были включены 10 пациентов, которым проводили микроэлектродную регистрацию активности одиночных нейронов и регистрацию локальных потенциалов поля (LFP) СТЯ во время нейрохирургических операций по вживлению электродов для глубокой стимуляции мозга (deep brain stimulation, DBS).

Для анализа зарегистрированные нейроны были поделены на три группы в соответствии с типом их активности – на тонические, пачечные и паузные клетки – с помощью метода иерархической кластеризации на основе алгоритма Уорда. Мы обнаружили, что пачечные нейроны в «аффектном» СТЯ характеризуются повышенной частотой пауз и сниженным межпаузным интервалом ($p < 0,05$ по U-тесту Манна-Уитни). Доля паузных клеток выше в «аффектном» СТЯ, но различий в их активности или в активности тонических нейронов не было обнаружено.

LFP были проанализированы путем оценки синхронности осцилляций (o-scores) в нескольких спектральных диапазонах после коррекции $1/f$. Мы показали, что мощность осцилляций в высокочастотном бета (20-30 Гц) диапазоне была значительно ниже, а наклон $1/f$ аperiодической компоненты значительно выше в «аффектном» СТЯ. Различий в низкочастотном бета-диапазоне (13-20 Гц), вопреки ожиданиям, обнаружено не было.

Наши результаты позволяют предположить, что более ритмичный характер активности пачечных нейронов СТЯ может быть маркером БП. Увеличение наклона аperiодической компоненты также могут быть связаны с этим расстройством, в то время как значимость колебаний в низко- и высоко-бета-диапазонах требует дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00344.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ СТЕВИИ НА ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Панова Э.В.^{1,2}, Зыкина Н.С.¹, Илюха В.В.¹

¹Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

²Институт биологии Карельского центра РАН, Петрозаводск, Россия

panova550@gmail.com

Чрезмерное потребление глюкозы стимулирует повышенное выделение инсулина, провоцирует развитие сахарного диабета и ведёт к увеличению массы тела, поэтому рекомендуется заменять её непитательными подсластителями, одним из которых является экстракт листьев стевии (ЭЛС). В связи с противоречивыми данными о влиянии препарата на организм млекопитающих, целью работы явилось изучить действие ЭЛС на биохимические показатели крови, активность пищеварительных ферментов и морфологию внутренних органов у мышей линии C57BL/6. На протяжении 2 месяцев 120 мышей линии C57BL/6 получали ЭЛС с питьевой водой в различных концентрациях: допустимая суточная доза (ДСД); ДСД, превышенная в 10 раз (ДСД*10). Контрольная группа (n= 60) получала воду без ЭЛС. В крови животных экспериментальных групп уровень общего холестерина повышался в пределах установленной нормы, а концентрации триглицеридов и глюкозы снижались по сравнению с контролем. ДСД и ДСД*10 вызывали повышение активности амилазы в поджелудочной железе (ПЖ), двенадцатиперстной (12ПК) и тонкой кишке (ТК). Активность липазы в ПЖ снижалась, в 12ПК – снижалась только при ДСД, в ТК – не изменялась. Общая протеолитическая активность в ТК повышалась, в ПЖ и 12ПК статистически значимо не изменялась. ДСД*10 ЭЛС вызывала гидронефроз почек и изменение окраса селезёнки, а также изменение веса данных органов. При ДСД добавка вызывала снижение массы ПЖ, сердца, печени (наблюдались её внешние и структурные изменения). Опираясь на полученные результаты, нельзя говорить о безопасности применения данного вещества в качестве пищевой добавки даже в разрешённой концентрации.

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ

Полякова Т.В.¹, Медведева В.П.², Миронова Г.Д.², Хундерякова Н.В.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

Renithiers996@yandex.ru

Определение функционального состояния митохондрий в организме или в культуре клеток – актуальная задача современной митохондриальной медицины, поскольку эти органеллы играют центральную роль в энергообеспечении и осуществлении эпигенетических метаболических функций клеток организма. Целью работы было исследовать активность двух

ключевых ферментов митохондрий – активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), альфа-кетоглутаратдегидрогеназы (КГЛ) и активность цитозольного фермента гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ), измерить соотношение ЛДГ/СДГ как эффекта Варбурга, характеризующего отношение гликолиза к дыханию. в культурах клеток миеломы мыши *NSO-1*, клеток яичника японского хомячка *Ch Exp Cho* в сравнении с лейкозными культурами *HL-60(M3)* и *ThP-1 (M5)*. Активность окислительных ферментов определяли цитобиохимическим (ЦБХ) методом в иммобилизованных на стекле культурах клеток по реакции восстановления красителя нитросинего тетразолия до темно синего формазана-продукта реакции, количество которого определяли с помощью компьютерных программ. Полученные данные изменений СДГ, ЛДГ и КДГ позволяют проследить перестройки путей окисления в митохондриях всех исследуемых культур клеток, называемых циклом Кребса, так как он основан на цепи превращений. Однако результаты работы выявляют большую подвижность цепи реакций. Главным направлением является функционирования Цикла при его анаболической, биосинтетической функции. При таком состоянии лимонная (ЛИМ) кислота не окисляется в митохондриях, а выходит в цитозоль для обеспечения биосинтезов Ацетилом-КоА. Этот процесс поддерживается особенно мощным притоком КГЛ из глутамин и превращением КГЛ в ИЗЛ и ЛИМ, при ингибированной активности СДГ и преобладании активности ЛДГ И КДГ (анаэробный гликолиз). При добавлении в *Ch Exp Cho* антибиотика *G418* было обнаружено уменьшение размеров клеток в 2 раза и активация всех дегидрогеназ в 4 и 5 раз с преобладанием митохондриальной активности СДГ. Таким образом, энергетический обмен в культивируемых клетках зависит от условий среды инкубации и может меняться в зависимости от биологических добавок. ЦБХ метод оценки активности дегидрогеназ может применяться как высокочувствительная тест система для определения метаболической направленности и регуляции в культурах клеток.

Работа поддерживается грантом РНФ №23-25-00441

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ TRKB В РЕГУЛЯТОРНОМ ДЕЙСТВИИ ПРОДУКТОВ СОЗРЕВАНИЯ НЕЙРОТРОФИНА МОЗГА В НОВООБРАЗОВАННЫХ МОТОРНЫХ СИНАПСАХ

Потапова Д.А., Богачева П.О., Правдивцева Е.С., Гайдуков А.Е.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

potapovadiana2001@mail.ru

Нейротрофин мозга (BDNF) обладает широким спектром трофических и регуляторных эффектов в нервной системе, как у здоровых животных, так и при патологиях. В моторных синапсах млекопитающих BDNF выделяется из скелетных мышц и оказывает пресинаптические эффекты, регулируя выброс медиатора.

проBDNF и продомен BDNF – продукты созревания нейротрофина мозга: проBDNF- крупная молекула-предшественник, подвергается протеолизу с образованием зрелого BDNF и продомена BDNF. В последние годы появились свидетельства наличия собственных эффектов и у проBDNF, и у продомена, однако их сигнальные функции в нервно-мышечных синапсах, особенно на ранней стадии их формирования, оставались совершенно не известными.

В данной работе изучали влияние проBDNF и продомена BDNF на параметры синаптической передачи в новообразованных моторных синапсах мышцы. Объектом служила мышца – длинный разгибатель пальцев (m. EDL). За 11 суток до электрофизиологического эксперимента проводили передавливание малоберцового нерва, что запускало процессы дегенерации, последующей регенерации и прорастания новых синапсов. Далее на изолированном нервно-мышечном препарате регистрировали спонтанные и вызванные потенциалы концевой пластинки (МПКП и ПКП) новообразованных синапсов с помощью стандартной микроэлектродной методики.

В присутствии проBDNF наблюдали небольшую гиперполяризацию мышечных волокон и снижение частоты МПКП. При этом параметры ПКП оставались неизменными. Считается, что пронеуротрофины, в том числе и проBDNF, оказывают свои воздействия путем взаимодействия с p75 рецепторами. Однако TAT-Per5, ингибитор p75-ассоциированного сигнального каскада Rho, не предотвратил эффекты проBDNF. Неожиданно, их предотвратил антагонист TrkB рецепторов циклотраксин B. Это позволяет предполагать существование в новообразованных синапсах неканонических путей действия проBDNF через TrkB рецепторы. Конечной мишенью действия проBDNF в новообразованных моторных синапсах, судя по наблюдаемой гиперполяризации и снижению частоты МПКП, могли быть G-белок-ассоциированные калиевые каналы входящего выпрямления (GIRK). Действительно, в присутствии их блокатора, тертиапина Q, эффекты проBDNF нивелировались.

Продомен BDNF в новообразованных моторных синапсах повышал амплитуду МПКП, не влиял на амплитуду ПКП, но при этом снижал квантовый состав ПКП. Эти эффекты полностью предотвращались при блокаде TrkB рецепторов. При этом блокада каналов GIRK никак не повлияла на проявление эффектов продомена. Таким образом, удалось установить, что и продомен BDNF имеет собственное модулирующее влияние на синаптическую передачу в новообразованных моторных синапсах, обусловленное активацией рецепторов TrkB.

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что продукты созревания нейротрофина мозга, действуя один и тот же тип рецепторов, TrkB, оказывают разные эффекты на синаптическую передачу и выброс медиатора, активируя разные сигнальные каскады, подробности которых требуют выяснения.

Работа поддержана грантом РФФ 22-25-00111.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ В ГИППОКАМПЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

Потапова С.С.^{1,2}, Ветровой О.В.^{1,2}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

vov210292@uyandex.ru

Индукцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF1 представляет собой ключевой регулятор энергетического метаболизма, обеспечивающий функционирование клеток в условиях недостатка кислородного снабжения. Ранее нами было показано, что во

время постгипоксической реоксигенации мозга HIF1 оказывает дезадаптивный эффект, ингибируя пентозофосфатный путь в гиппокампе крыс и тем самым вызывая состояние окислительного стресса и последующую гибель нейронов. Настоящая работа направлена на исследование эффектов пренатальной гипоксии (ПГ) на экспрессию HIF1 в структурах мозга крыс на протяжении жизни, а также на анализ активности пентозофосфатного пути (ПФП) и анаэробного гликолиза у взрослых интактных (контрольных и ПГ) животных и при их реакции на эмоциональный стресс.

В цитозольной и ядерной фракциях гиппокампа 1-дневных ПГ крысят выявлено увеличение количества HIF1 α , уменьшение количества мРНК HIF1-супрессируемого гена *gbpd* и увеличение количества мРНК HIF1-индуцируемого гена *ldhA*. Повышенная белковая экспрессия HIF1 α стабильна в гиппокампе ПГ крыс во взрослом возрасте (3 месяца) и в процессе старения (18 месяцев). В опытах на взрослых животных показано, что повышенная белковая экспрессия HIF1 α , вызванная ПГ, сопровождается увеличением эффективности анаэробного гликолиза, проявляющемся в увеличении активности ЛДГ и концентрации лактата. При этом количество Г6ФДГ, концентрация НАДФН и восстановленного глутатиона в гиппокампе ПГ крыс снижены. В ответ на стрессирование в гиппокампе контрольных крыс происходит увеличение количества HIF1 α , сопровождающееся повышением эффективности анаэробного гликолиза и уменьшением эффективности ПФП до значений, сходных с показателями у интактных ПГ крыс. В свою очередь стрессирование ПГ крыс вызывает увеличение содержания HIF1 α без изменений эффективности анаэробного гликолиза и ПФП.

Таким образом, увеличение содержания и транскрипционной активности индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF1 α в гиппокампе крыс, переживших пренатальную гипоксию, сохраняется на протяжении всей жизни, что вовлекается в нарушение баланса между гликолизом и пентозофосфатным путем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) в рамках проекта Научные центры мирового уровня Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости», направление: «Биологические и социальные основы инклюзии».

ВЛИЯНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА КОЛИЧЕСТВО И АКТИВНОСТЬ ФАРНЕЗОИД X РЕЦЕПТОРА И ПЕЧЕНОЧНОГО РЕЦЕПТОРА X *IN VITRO*

Рокунов Е.Д., Сеидкулиева А.А., Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова
Минздрав РФ, Рязань, Россия

rokunov1999@mail.ru

Фарназоид X рецептор (FXR) и печеночный рецептор X (LXR) – это орфанные рецепторы, являющиеся членами суперсемейства ядерных рецепторов. Доказана важная роль FXR в регуляции синтеза желчных кислот, LXR – метаболизма липидов и холестерина. Также эти рецепторы (FXR, LXR) могут принимать участие в регуляции ферментов I и II фазы биотрансформации (например, изоферментов цитохромов P450), и белков-транспортёров.

Цель исследования – оценить количество и активность фарназоед X рецептора (FXR) и печеночного рецептора X подтипа альфа (LXR α) при воздействии половых гормонов *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на клетках линии HepG2, гиперэкспрессирующих FXR и LXR α . Клетки инкубировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), с эстрадиолом и прогестероном концентрациях 1, 10, 100 мкМ в течении 24 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме добавляли этанол (растворитель тестируемых веществ) в конечной концентрации 0,0001%. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения. Относительное количество FXR и LXR α оценивали методом вестерн-блот с использованием первичных кроличьих поликлональных антител Farnesoid X Receptor и Polyclonal Antibody to Liver X Receptor Alpha («Cloud-Clone Corp», КНР) в концентрации 1:200. Для оценки локализации изучаемых рецепторов под действием гормонов проводили иммуноцитохимическое исследование. Клетки визуализировали при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония). Полученные результаты анализировали дисперсионным анализом ANOVA, с помощью критерия Даннета.

Результаты. Эстрадиол повышал количество FXR в клетках линии HepG2 при воздействии в течении 24 ч в концентрациях 1 мкМ на 26,2% ($p=0,05$), 10 мкМ – 37,3% ($p=0,03$) и 100 мкМ – 64,4% ($p=0,0007$) соответственно. Влияние прогестерона при инкубации 24 ч в концентрации 100 мкМ не вызывало изменения количества данного рецептора, в концентрациях 1 и 10 мкМ приводило к увеличению относительного количества FXR на 162,5% ($p<0,0001$) и на 128,8% ($p<0,0001$) соответственно по сравнению с группой контроля. При иммуноцитохимическом исследовании влияния эстрадиола усиливалась интенсивность флуоресценции ядер клеток, что свидетельствует об активации рецептора и транслокации его в ядра. Воздействие прогестерона усиливало интенсивность реакции только с ядерной мембраной. Относительное количество LXR α не изменялось под влиянием эстрадиола в тестируемых концентрациях относительно контрольной группы. В свою очередь, воздействие прогестерона в концентрации 100 мкМ не влияло на изменение количества LXR α в концентрации 1 мкМ приводило к индукции LXR α и увеличению его уровня на 75,2% ($p<0,00001$), в концентрации 10 мкМ – на 159,6% ($p<0,0001$) соответственно. Иммуноцитохимическое исследование выявило, что при воздействии эстрадиола и прогестерона положительная реакция с ядрами клеток существенно не изменялась, значит, рецептор LXR α не транслоцировался в ядро под действием данных гормонов, то есть не происходила его активация.

Заключение. Таким образом, под действием эстрадиола (1-100 мкМ) количество и активность FXR возрастали, а для LXR α – не изменялись. Прогестерон (1-10 мкМ) способствовал увеличению относительного количества FXR и LXR α , активации FXR, но не LXR α в клетках линии HepG2.

О СВОЙСТВАХ ХЛОРОФИЛЛИНА В СУСПЕНЗИЯХ ЛИМФОЦИТОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Ромодин Л.А.^{1,2}

¹Государственный научный центр РФ – Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

²Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия

rla2904@mail.ru

Несмотря на то, что проблемой поиска эффективных, и при том не обладающих химической токсичностью, радиозащитных препаратов активно занимаются с середины XX века, считать её решённой на настоящий момент не представляется возможным.

В литературе имеются сообщения, что препараты на основе хлорофилла могут обладать значительными радиозащитными свойствами (подробнее в [1]). Перспективным видится применение хлорофиллина – водорастворимого продукта омыления хлорофилла.

В эксперименте по облучению суспензии человеческих лимфоцитов, предварительно инкубированных в растворах Na-Cu-хлорофиллина (*Хл*) концентрациями 5–100 мкМ, рентгеновским излучением в дозе 2 Гр влияния *Хл* на степень повреждения ДНК, оценённую методом щелочного гель-электрофореза единичных клеток, обнаружено не было.

В проведённом далее эксперименте спектрофотометрически было обнаружено содержание *Хл* в лизате лимфоцитов, отделённых от среды инкубации, содержащей 300 мкМ *Хл*. Это позволяет предположить, что он способен проникать через плазмалемму из межклеточной среды в цитоплазму.

Но через ядерную мембрану *Хл*, видимо, не проникает. Этим объясняется то, что он не смягчил деструктивное действие рентгеновского излучения на ДНК лимфоцитов в облучённой суспензии, а в работах [2, 3] показал генопротекторный эффект на клетках костного мозга и сперматогониях облучённых мышей. Эти клетки постоянно претерпевают митоз, в ходе которого ядерная мембрана разрушается. Поэтому *Хл* из цитоплазмы легко оказывался в их ядрах, где уже мог защитить их генетический аппарат.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

Литература.

1. Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. // Биофизика. 2022. 67(1):96–104. doi: 10.31857/S0006302922010094
2. Morales-Ramirez P., Mendiola-Cruz M.T. // Mutation research. 1995. 344(1-2):73–78. doi: 10.1016/0165-1218(95)90041-1
3. Morales-Ramirez P., Garcia-Rodriguez M.C. // Mutation research. 1994. 320(4):329–334. doi: 10.1016/0165-1218(94)90085-x

ТОПОГРАФИЯ СЛУХОВЫХ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В ТИШИНЕ И В УСЛОВИЯХ МАСКИРОВКИ

Саликова Д.А., Шестопалова Л.Б., Петропавловская Е.А., Семенова В.В.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

dasalikova@edu.hse.ru

Согласно одной из теорий, анализ слуховой пространственной информации реализуется контралатерально. Согласно другой теории, существует правостороннее доминирование. Имеются также свидетельства более сложной картины латерализации мозговой активности, получившей название «модель игнорирования» (neglect model) и описывающей различия в степени контралатеральности между левой и правой слуховой корой. В данной работе исследована межполушарная асимметрия электрической активности мозга в условиях слуховой пространственной маскировки. Использованы неподвижные маскиры различной латерализации и движущиеся тестовые сигналы. Пространственные эффекты создавали за счет интерауральных различий по интенсивности. Регистрировали ответы на включение сигнала (ON-ответ), на начало движения (motion-onset response, MOR) и на выключение сигнала (OFF-ответ) при предъявлении на фоне маскира и в тишине. Для построения топограмм и анализа асимметрии измеряли амплитуды каждого компонента реакции, усредненные в симметричных электродных кластерах левого и правого полушарий. Анализ ON-ответов показал, что волна N1 демонстрирует контралатеральное преобладание при предъявлении сигнала в тишине, а при маскировке контралатеральность усиливается. Межполушарная асимметрия компонента P2 отсутствовала при предъявлении сигнала в тишине, а во всех комбинациях маскира и сигнала амплитуда P2 была больше в правом полушарии. Асимметрия обоих компонентов была максимальной при разнесении маскира и начального участка сигнала на 180 град. Напротив, в реакции на начало движения (MOR) асимметрия проявлялась только в тишине: волна cN1 была более выражена на стороне, контралатеральной сигналу. Топография OFF-ответа не зависела от присутствия маскира.

НОВЫЕ ЛИГАНДЫ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ СНИЖАЮТ РИСК ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Северюхина М.С.^{1,2}

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

²Филиал Института биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН,
Пушино, Россия

Sms21111998sms@gmail.com

Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что активация никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) может уменьшить повреждение сердца в результате ишемии и последующей реперфузии. Использование агонистов nAChR на различных животных моделях приводит к уменьшению реперфузионного повреждения.

Цель. На модели острого инфаркта миокарда (ОИМ) у крыс SD изучить эффективность частичных агонистов nAChR – Варениклина и Цитизина.

Методика. В эксперименте использовались самцы крыс SD в возрасте 18-20 недель. Трех группам животных моделировали ОИМ 30-мин окклюзией левой коронарной артерии и 90-мин реперфузией под уретановым наркозом при искусственной вентиляции легких. Введение тестируемых веществ или физиологического раствора осуществляли за 5 мин до окклюзии левой коронарной артерии через катетер, имплантированный в вену. Кровь для биохимического анализа в объеме 0,5 мл собирали из венозного катетера до момента окклюзии, а также в конце реперфузионного периода. В ходе эксперимента регистрировали параметры ЭКГ, АД и ЧСС. По окончании реперфузионного периода сердце делили на 5 срезов и подвергали методике «двойного окрашивания», после чего сканировали и подсчитывали зону инфаркта, зону риска и площадь среза левого желудочка.

Результаты. Не было выявлено случаев гибели животных во время эксперимента. Определение анатомической зоны риска не выявило отличий в экспериментальных группах, тогда как размер зоны инфаркта различался в контроле и группах с введением агонистов. Так, введение агонистов nAChR Варениклина и Цитизина за 5 мин до окклюзии приводило к статистически достоверному снижению размера инфаркта до $15,7 \pm 8,5$ % и $19,6 \pm 6,2$ % соответственно (относительно контроля $32,0 \pm 7,7$ %).

ЭКГ показало наличие аритмий, что является признаком ишемии. Во время окклюзии аритмии были наиболее продолжительными и интенсивными. Во время реперфузии аритмии исчезли в течение первых 5-15 минут. Статистически значимых различий в артериальном давлении и частоте сердечных сокращений между контрольной группой и экспериментальными группами не выявлено.

Биохимический анализ крови показал, что некоторые параметры изменялись у животных экспериментальных групп. В группе «Контроль» достоверно увеличивались концентрации мочевины, АСТ, креатинина, а общий белок снижался относительно исходных значений, что свидетельствует о разрушении клеток и ускорении катаболизма белка. В экспериментальных группах, помимо этих изменений, уменьшалась концентрация холестерина и АЛТ. Анализ определения электролитов крови показал снижение концентрации ионов натрия и ионов хлоридов, тогда как изменения концентраций ионов калия были минимальными. Снижение хлора в сыворотке наблюдается при повреждении тканей, при некрозах. Снижения натрия характерно для патологии почек или уменьшении общего содержания натрия в организме, вследствие сокращения внеклеточного водного пространства.

Вывод. В данной работе на модели ишемии миокарда изучено действие агонистов nAChR. Тестируемые соединения значительно уменьшают повреждение миокарда, при этом Варениклин проявляет более высокую защиту, что открывает новый путь использования этих веществ в качестве кардиозащитных средств.

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА НА КОНСТИТУТИВНЫЙ АНДРОСТАНОВЫЙ РЕЦЕПТОР

Сеидкулиева А.А., Абаленихина Ю.В., Рокунов Е.Д., Щулькин А.В.

Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава РФ,
Рязань, Россия

adamiana@inbox.ru

Введение. Окислительный (ОС) и нитрозативный стресс (НС) относятся к типовым патологическим процессам, которые развиваются из-за избыточной продукции активных форм кислорода и азота (АФК/АФА) или снижения емкости антиоксидантной защиты. ОС и НС, а также их продукты могут способствовать повреждению клеточных структур и, как следствие, нарушению внутриклеточных процессов.

Цель. Оценить влияние окислительного и нитрозативного стресса на конститутивный андростановый рецептор.

Материалы и методы. Исследования проведены *in vitro* на клеточной линии Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека). В качестве донора оксида азота использовали S-нитрозоглутатион (GSNO) в диапазоне концентраций 1-500 мкМ, в качестве прооксиданта – пероксид водорода (H_2O_2) в концентрациях 0,1-100 мкМ. Клетки инкубировали с тестируемыми веществами в течение 3, 24 и 72 ч. Относительное количество CAR оценивали методом вестерн-блот. Полученные результаты обрабатывали с помощью дисперсионного анализа с последующими попарными сравнения с применением критерия Даннетта.

Результаты. При инкубации клеток с H_2O_2 в течение 3 ч и 24 ч во всех концентрациях уровень CAR не изменялся. Увеличение длительности инкубации до 72 ч приводило к повышению количества CAR при концентрациях H_2O_2 5, 10, 50 мкМ и к снижению данного показателя при концентрациях H_2O_2 100 мкМ. Воздействие GSNO во всех концентрациях в течение 3 и 24 ч не влияло на количество CAR. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ приводило к его увеличению, однако в концентрациях 100 и 500 мкМ данный показатель снижался.

Выводы. При развитии умеренного ОС и НС происходит повышение CAR, при выраженной патологии отмечается снижение количества данного рецептора.

СТРУКТУРЫ ПЕРИЛЕН-КРАСИТЕЛЬ КАК ФОТОТЕРАНОСТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Сизов Л.Р.¹, Козлов А.В.¹, Филатова Н.В.¹, Рыбкин А.Ю.¹, Горячев Н.С.^{1,2}

¹ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Leo.Sizoff@yandex.ru

В настоящий момент активно развивается направление фототераностики – комбинации метода фотодинамической терапии, эффективного неинвазивного метода лечения онкологических заболеваний, и метода флуоресцентной диагностики. Основную роль в данном направлении играет препарат-фотосенсибилизатор, который при возбуждении светом генерирует в раковых клетках высокотоксичные активные формы кислорода и обладает выраженным сигналом флуоресценции. Современные препараты работают преимущественно по фотодинамическому механизму II типа, при котором образуется синглетный кислород, однако эффективность таких фотосенсибилизаторов сильно падает в гипоксических условиях солидных опухолей. С этой точки зрения перспективными выглядят нетоксичные органические донорно-акцепторные структуры, работающие по менее зависимому от концентрации кислорода в среде фотодинамическому механизму I типа, при котором образуются различные радикальные формы, основным из которых является супероксид анион-радикал.

Нами были синтезированы ковалентно-связанные структуры на основе перилендиимида (PDI) и цианинового красителя IR780 (PDI-IR780), а также перилендиимида и пиррофеофорбида (PDI-PP), в которых производное перилена выступало акцептором электрона, а краситель – одновременно и донором электрона, и антенной, поглощающей в красной и ближней инфракрасной областях спектра, наиболее подходящих для фототераностики. Для растворения в воде полученные соединения включались в состав наночастиц на основе поливинилпирролидона.

Показано, что в данных структурах происходит лишь частичное тушение флуоресценции красителя, что говорит о слабом взаимодействии донорной и акцепторной частей. Диада PDI-IR780 не генерировала синглетный кислород, однако эффективность генерации супероксид анион-радикала повысилась в 6.2 раза. Квантовый выход синглетного кислорода PDI-PP снизился в 5 раз по сравнению с исходным красителем метилпиррофеофорбидом, тогда как эффективность генерации супероксид анион-радикала повысилась в 2.7 раза. Полученные результаты позволяют предположить наличие фотоиндуцированного переноса электрона с красителя на периленовый фрагмент.

Фотодинамический эффект соединений исследовали на клеточной линии HeLa с использованием МТТ-теста. Планшеты с клетками и изучаемыми соединениями облучали светом с длиной волны >700 нм для PDI-IR780 и 660 нм для PDI-PP. Структура PDI-PP оказала выраженное фотодинамическое воздействие на раковые клетки – с освещением клеток доза IC₅₀ составила 1.8±0.5 мкМ – и имела низкую темную токсичность (IC₅₀>15 мкМ). Для PDI-IR780 не было зарегистрировано фотодинамического эффекта, что, по-видимому, связано с относительно низкой генерацией активных форм кислорода.

Таким образом, структуры перилен–краситель могут быть интересны для создания агентов для флуоресцентной диагностики в ближней инфракрасной области (PDI-IR780) и фотосенсибилизаторов I типа для фотодинамической терапии (PDI-PP).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-00274).

КЛАССИФИКАЦИЯ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ПОЛЯ CA1 ГИППОКАМПА В ЗАПИСЯХ *IN VIVO*

Скорород С.Н.¹, Дубровин С.В.², Васильев А.О.³, Мысин И.Е.³

¹Санкт-Петербургский Политехнический Университет им. Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

skorohod.sn@edu.spbstu.ru

Интернейроны — тормозные нейроны неокортекса и гиппокампа. По морфологическим и функциональным параметрам интернейроны разделяются на 17-40 подклассов. В гиппокампе всего от 9 до 20% числа нейронов составляют интернейроны. Интернейроны регулируют активность пирамидных клеток, кодирующих информацию. Они необходимы для осуществления многих важных аспектов работы мозга, имеющих непосредственное отношения к процессам восприятия и мышления. Из-за своей малочисленности и неоднородности интернейроны слабо изучены.

Цель работы состоит в построении классификатора для определения типа нейрона поля CA1 гиппокампа по его активности *in vivo*. Поле CA1 было выбрано по причине наибольшей изученности активности его интернейронов. На первом этапе мы собрали описание 7 популяций интернейронов: парвальбумин- и холецистокинин-содержащие корзинчатые, аксо-аксональные, ОЛМ, Иви, дендритные и нейроглиформные нейроны. Эти типы выбраны как наиболее изученные и полно описанные. Характеристиками, отличающимися у разных типов нейронов, являются: распределение активности по фазе тета-ритма, и частота спайков в различных состояниях – «тета», «не-тета», «риппл».

На втором этапе мы использовался набор записей hc-3 с ресурса crcns.org. Мы рассчитали характеристики, приведенные выше, для 701 нейрона. Для классификации записи сначала кластеризовали на 7 групп методом к-ближайших соседей и затем, на основании собранных экспериментальных данных о характеристиках нейронов каждого типа, каждой группе был сопоставлен определенный класс. Качество классификации для большинства нейронов оказалось хорошим.

Таким образом, мы предложили метод, позволяющий определять тип интернейрона по его электрофизиологическим характеристикам. Информация о типе регистрируемых нейронов позволит проводить корреляции между другими параметрами активности нейрона и исследуемыми факторами. В свою очередь, это позволит выявить функциональную роль каждого типа интернейронов.

АНАЛИЗ ЭКСПОНИРОВАНИЯ Кальретикулина на поверхности клеток Глиомы, подвергшихся фотодинамически-индуцируемой клеточной гибели с использованием тетраарилтетраанопорфиразина (Pz II)

Слепцова Е.Е.¹, Турубанова В.Д.¹, Редькин Т.С.¹, Савюк М.О.¹,
Ведунова М.В.¹, Крысько Д.В.^{1,2}

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Гентский университет, Гент, Бельгия

ees222@list.ru

В предыдущих исследованиях уже была показана эффективность фотодинамического воздействия (ФДТ) на основе тетраарилтетраанопорфиразинов (pz I, pz II, pz III, pz IV) в отношении клеток глиомы GL261, а также проанализированы процессы испускания некоторых молекул DAMPs (АТФ и HMGB1). В настоящей работе рассматривается процесс высвобождения кальретикулина, одной из основных молекул DAMPs, которая обычно выделяется во время ранней фазы иммуногенной клеточной смерти.

Целью исследования было проанализировать уровень высвобождения кальретикулина при клеточной гибели, опосредованной ФДТ на основе одного из тетраарилтетраанопорфиразинов (pz II).

Клеточную гибель индуцировали ФДТ. Клетки глиомы GL261 инкубировали с pz II в течение 4 часов, после чего облучали. После культивирования соответствующее для группы количество часов (1,5; 3; 18 или 24), клетки окрашивали антителами к кальретикулину и ДНК-специфичным красителем Sytox Green. Образцы анализировали методом проточной цитометрии. Поверхностный кальретикулин определяли для Sytox Green негативных клеток. В качестве контрольной группы использовали клетки GL261, убитые несколькими циклами заморозки-оттаивания

Было показано, что в первые часы после фотоиндукции активно возрастает количество клеток, экспонирующих кальретикулин на поверхности клеточной мембраны. При этом если в случае индукции клеточной смерти фотодинамическим воздействием на основе порфиразинов все живые клетки, начиная с точки 1,5 часа, экспонируют кальретикулин, то в случае клеток, убитых несколькими циклами заморозки-оттаивания, лишь половина из всех живых экспонирует кальретикулин.

Это позволяет говорить о более высоком иммуногенном потенциале фотоиндуцированных клеток. Также продолжительное экспонирование кальретикулина среди еще живых клеток позволяет утверждать, что это ранний DAMP's, выделяющийся в первые минуты после фотоиндукции умирающими клетками и поддерживаемый только в первые часы на высоком уровне.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00716,
<https://rscf.ru/project/22-25-00716/>

ПОИСК СПОСОБОВ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ДЕЙСТВИЯ ИБОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЦНС

Стрелков М.С.¹, Быков М.А.¹, Фетисов А.И.¹, Тутукина М.Н.^{1,2}

¹Школа на Юго-Востоке им. Маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

maxims3relkov@gmail.com

Иботеновая кислота (ИБК) – это психо- и нейроактивное вещество, являющееся биоизостером глутамата – нейромедиатора ЦНС. ИБК содержится в мухоморах вида *Amanita muscaria* и других родственных видах грибов, после употребления которых ИБК попадает в кровь и проникает через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. При высокой дозе возможны отёк головного мозга и летальный исход. Современный подход к лечению отравления ИБК и мусцимола представляет собой типичный комплекс мер при пищевом отравлении и симптоматическое лечение, тогда как антагонисты ИБК не применяются в силу их собственной токсичности и большого количества сопутствующих побочных эффектов. Цель нашей работы – поиск веществ, способных ингибировать и нейтрализовать действие ИБК. В связи с данной целью мы поставили перед собой задачи найти агент, который препятствует воздействию иботеновой кислоты на рецепторы, и тем самым не допускает её воздействия на ЦНС или существенно его снижает; изучить метаболизм ИБК в организме и проверить взаимодействие выбранного агента с ее метаболитами; найти способ получения данного агента.

ИБК, как и глутамат, является агонистом NMDA-рецептора, состоящего из 4 субъединиц. Это позволило предположить, что сайты связывания ИБК, вероятно, совпадают с сайтами связывания глутамата. Поэтому на первом этапе были проанализированы научные статьи, в которых описаны сайты связывания глутамата во всех четырех субъединицах рецептора. Затем, из базы данных NCBI были взяты их аминокислотные последовательности и отмечены участки, формирующие известные сайты связывания глутамата. Далее были смоделированы структуры субъединиц NMDA-рецепторов и проведён молекулярный докинг на них молекул глутамата и ИБК. Оказалось, что изменение свободной энергии Гиббса при взаимодействии ИБК со всеми субъединицами больше, чем при взаимодействии с глутаматом (например, -5 и -3.9, -5.8 и -4.4, соответственно). Это значит, что она может вытеснять глутамат из его сайтов. Более того, в GluN2C и GluN2D были найдены дополнительные сайты связывания ИБК с очень низкой энергией связывания. Это может помочь использовать эти две субъединицы как «ловушки» для связывания ИБК в организме. При попадании в организм примерно 20% ИБК декарбоксилируется до мусцимола, который активирует ГАМК(A) рецепторы и тем самым тормозит нейрональную активность. Помимо этого, мусцимол имеет два возможных пути метаболизма, в ходе которых образуются также токсичные изоксазольные вещества. Поэтому задача нейтрализации мусцимола тоже очень важна. Мы оценили, могут ли выбранные нами фрагменты GluN2C и GluN2D связывать мусцимол – и оказалось, что могут, с энергией, сравнимой с энергией его связывания с ГАМК-рецепторами. С помощью моделирования мы выбрали структурно стабильные участки «ловушек» для их дальнейшей наработки в клетках эукариот (в плазмиде pCDNA3.1(+)) и бактерий (pGEX-6P-2). В обеих плаزمиде есть сайты рестрикции BamHI и XhoI, что позволило подобрать универсальные праймеры. Затем мы выделили ДНК из слюны человека, с которой с помощью ПЦР были амплифицированы необходимые фрагменты. После рестрикции фрагменты были лигированы в бактериальную и эукариотическую плазмиды для дальнейшей наработки и очистки с помощью аффинной хроматографии.

РЕГИСТРАЦИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОКАЛИЗАЦИЙ, КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ И ВАЛИДАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ ПРИ НЕОНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ ГРЫЗУНОВ

Тарасов А.С.^{1,2}, Фролов Е.М.¹

¹Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

²Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

Tarasov.pharm@ya.ru

Неонатальная гипоксия (НГ) является причиной возникновения неврологических нарушений у около 1 миллиона новорожденных, ведущим к стойким отклонениям в развитии. Неврологические нарушения при НГ разнообразны, и могут отражаться на характеристиках ультразвуковых вокализаций (УВ) лабораторных животных в условиях эксперимента.

Целью исследования является регистрация и анализ УВ животных в качестве критерия оценки тяжести психоневрологических нарушений у лабораторных грызунов при моделировании неонатальной гипоксии в качестве моделей задержки развития.

Эксперимент проводился на семидневных щенках крыс линии «Wistar», фенотипированных по весу. Животные случайным образом были распределены на 4 группы: 2 основные — грызуны, перенесшие гипоксию (инкубация в течении 3х часов в камере с 8% содержанием кислорода, 92% азота), и группа животных, подвергшихся односторонней перевязке сонной артерии с гипоксией (модель Райса–Ваннуччи), и 2 контрольные (интактные и ложно оперированные). В возрасте 2 месяцев была проведена серия тестов, направленных на изучение поведенческих реакций, неврологической симптоматики и когнитивной сферы.

При анализе результатов был отмечен выраженный неврологический дефицит в основных группах с экспериментальной патологией. Нарушения были более выражены в тестах, связанных с оценкой исследовательской активности и мелкой моторики передних конечностей, особенно в группе с сочетанной патологией. В тестах, нацеленных на изучение нарушений двигательной активности выраженность изменений была меньше, но оставалась значительной в сравнении с интактной группой. Выявлена корреляция неврологических нарушений с частотными и скоростными характеристиками УВ, что может позиционировать регистрацию и анализ УВ как возможный дополнительный метод оценки неврологических нарушений у грызунов в фармакологическом эксперименте.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования УВ в качестве дополнительного поведенческого маркера в комплексной оценке состояния модельных организмов (грызунов) в условиях эксперимента.

УДК 616-008:612.397

КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ НАРУШЕНИЕМ ОБМЕНА ДОФАМИНА

Трактиров Д.С.¹, Куликова Е.Д.^{1,2}, Пестерева Н.С.¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

ds.traktirov@gmail.com

Среди нервно-психических заболеваний у детей одним из самых сложных с точки зрения ранней диагностики и лечения является синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ). На сегодняшний день этиология данного заболевания не установлена. Наиболее распространённой моделью для изучения патогенеза СДВГ являются крысы с генетически детерминированным нарушением обмена дофамина. Целью данной работы являлось исследование когнитивных способностей и поведенческих особенностей крыс линии DAT-KO (животные нокаутные по гену транспортера дофамина, dopamine transporter knockout).

Исследование проводилось на крысах DAT-WT (дикий тип, n = 11), DAT-НЕТ (гетерозиготы, n = 21), и DAT-KO (полный нокаут гена DAT, n = 10). Анализ двигательной активности проводился с использованием теста «Открытое поле» (ОП) на 30-ый день постнатального развития. Когнитивные навыки животных оценивали в тесте «водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) на 30-35 день постнатального развития.

В ходе проведения теста ОП оказалось, что КО-животные демонстрируют значительно более высокую скорость передвижения и большее пройденное расстояние по сравнению с крысами WT и НЕТ. Траектории движения крыс группы КО в тесте отличались от траекторий движения крыс WT и НЕТ и имели выраженный стереотипный круговой паттерн.

В тесте ВЛМ было обнаружено, что на 35-ый день постнатального развития (день тестирования в тесте ВЛМ) процент времени, проведённый животными разных групп в целевом квадранте, значимо различался. Оказалось, что животные группы КО проводят в целевом квадранте в два раза меньше времени, а животные группы НЕТ – на 30%, чем животные WT, что свидетельствует о нарушении у этих животных пространственной памяти.

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект № 22-25-00124.

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА КРЫСАМ НА СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОГЕННОГО КОРТИКОСТЕРОНА

Тютюнник Т.В., Карпенко М.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

t.tanjon11@yandex.ru

Глюкокортикоиды (ГК) – это класс стероидных гормонов, синтезирующихся в коре надпочечников и проявляющих свое биологическое действие через глюкокортикоидные рецепторы (ГР). Эти рецепторы стероидных гормонов присутствуют во всех тканях, включая головной и спинной мозг, при этом в ЦНС наиболее высокая экспрессия у людей и грызунов наблюдается в гипоталамусе и гиппокампе, которые являются местом активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Именно в этих структурах ГР опосредуют петлю отрицательной обратной связи этой оси. Так, ГР активируется только при высоких концентрациях кортикостерона, например, в ответ на стресс.

В наших предыдущих исследованиях мы выяснили, что введение дексаметазона в дозе 8 мг/кг приводит к изменению профиля экспрессии нейроспецифических генов, однако оказываемый в такой высокой дозе эффект на концентрацию эндогенных глюкокортикоидов неизвестен. Поэтому целью нашей работы было определить содержание эндогенного кортикостерона у крыс, на примере гиппокампа, и в крови после однократного введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг на разных сроках после введения.

В эксперименте использовались 24 половозрелых самца крыс Wistar, которых случайным образом распределили на 8 групп по 3 головы в каждой. Животным вводился дексаметазон в дозе 8 мг/кг и производилась декапитация на разных сроках (1, 3, 9, 12, 18, 24, 48 часов – время декапитации после введения, группа 0 – контрольная группа с введением физ. раствора). Использовался метод иммуноферментного анализа для определения содержания кортикостерона в гиппокампе и крови крыс. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, сравнение проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением *post hoc* критерия Тьюки.

Оказалось, что в клетках гиппокампа содержание кортикостерона в группе «24» было выше чем контрольной группе («0») в 8 раз ($p=0,005$), выше чем в группе «1» в 2,5 раза ($p=0,034$), выше чем в группе «12» также в 2,5 раза ($p=0,040$) и выше чем в группе «48» в 16 раз ($p=0,003$). В данной структуре в группе с временной точкой в 3 часа содержание кортикостерона было выше в 11 раз ($p=0,037$) чем в группе «48».

В сыворотке крови содержание кортикостерона в группе «48» было выше чем в группе «3» в 2 раза ($p=0,016$), в группе «9» в 5 раз ($p=0,002$), выше чем в группе «12» в 3 раза ($p=0,005$), выше чем в группе «18» в 4 раза ($p=0,003$), выше чем в группе «24» в 1,5 раза ($p=0,012$). В группе «24» содержание данного эндогенного глюкокортикоида было ниже чем в группе «0» (контрольной группе) в 3,5 раза ($p<0,001$) и ниже чем в группе «1» в 2 раза ($p=0,035$). В группе «18» уровень кортикостерона был меньше, чем в группе «0» (контрольной группе) в 5,5 раза ($p<0,001$) и ниже чем в группе «1» в 3,5 раза ($p=0,009$). В группе «12» содержание кортикостерона было ниже, чем в группе «0» (контрольной группе) в 4,5 раза ($p<0,001$) и ниже, чем в группе «1» в 2 раза ($p=0,016$). В группе «9» уровень исследуемого вещества был меньше, чем в группе «0» (контрольной группе) в 7 раз ($p=0,030$) и ниже, чем в группе «1» в 4 раза ($p=0,006$). В группе «3» кортикостерона было меньше, чем в группе «0» (контрольной группе)

в 3 раза ($p < 0,001$) и ниже, чем в группе «1» в 2 раза ($p = 0,045$). Так же в контрольной группе «0» содержание кортикостерона было больше, чем в группе «1» в 1,5 раза ($p = 0,025$).

Таким образом, заметна тенденция к увеличению кортикостерона в клетках гиппокампа крыс к 24-му часу после введения и нормализация к 48-му часу после введения. В крови наблюдается обратный эффект – снижение уровня кортикостерона с 1-го часа после введения и нормализация к концу вторых суток после введения.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ КОМПЛЕКСОВ ТИТИНА И МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Урюпина Т.А.¹, Бобылёва Л.Г.¹, Тимченко М.А.¹, Вихлянцев И.М.^{1,2}, Бобылёв А.Г.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Казанский федеральный университет, Казань, Пушино, Россия

tatyanauta98@gmail.com

Амилоидная агрегация – процесс, при котором белок изменяет нативную конформацию и формирует нерастворимые агрегаты. Считается, что амилоидные агрегаты токсичны и их образование связано с заболеваниями. Однако существуют также амилоидные агрегаты, необходимые для выполнения определённых функций – функциональные амилоиды. Главной отличительной особенностью амилоидных агрегатов является наличие четвертичной кросс- β структуры, благодаря которой амилоиды имеют относительно высокую прочность и устойчивость к протеолизу. Несмотря на то, что амилоидные агрегаты имеют общие свойства, на структурном уровне у них могут быть различия. Эти структурные особенности являются в наименьшей степени изученными. Нет данных, которые могли бы объяснить основные отличия между функциональными и патологическими амилоидными агрегатами.

В наших исследованиях было показано, что титин гладких мышц и миозин-связывающий белок С (С-белок) поперечнополосатых мышц способны формировать *in vitro* амилоидные агрегаты. Эти белки относятся к белкам семейства титина и состоят из иммуноглобулин-подобных и фибронектин-подобных доменов с бета-складчатой структурой. Особенностью белков этого семейства является относительно высокая скорость агрегации без изменений во вторичной структуре, которые происходят в структуре других белков при формировании амилоидов. Исходя из этого, мы предположили, что способность титина и белков его семейства формировать *in vitro* амилоидные агрегаты может являться следствием функциональной агрегации этих белков в клетках *in vivo*.

В данной работе методом атомно-силовой микроскопии исследована морфология комплексов титина и С-белка, тесно взаимосвязанных в саркомерах поперечнополосатых мышц позвоночных животных. Показано, что в растворе, содержащем 150 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7,0, белки коагрегировали в структуры, которые можно описать как сферические агрегаты диаметром 100-500 нм и высотой до 50-200 нм. Агрегаты распределялись в поле зрения либо в виде случайных скоплений сферических структур, либо в виде ветвящихся структур, также состоящих из сферических агрегатов. В растворе, содержащем 175 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7,0, агрегаты комплексов «титин/С-белок» были представлены в виде плёнки, распределённой по всему полю зрения. Поверхность

плёнки была неравномерной и изредка на ней можно было наблюдать крупные сферические частицы. Визуализированные структуры комплекса «титин/С-белок» отличались по морфологии от структур, которые формировали по отдельности титин (агрегаты, напоминающие по структуре губку) или С-белок (аморфные агрегаты или фибриллы).

Полученные данные важны для понимания взаимодействия между белками саркомерного цитоскелета титином и С-белком в А-дисках саркомеров. Дальнейшего исследования будут направлены на выяснения структурных особенностей в молекулах титина и С-белка при формировании ими белковых комплексов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 22-24-00805).

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ГАМК-ЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ ПРИ СТАРЕНИИ

Усатых А.А., Ивлев А.П., Наумова А.А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

andrew.usatih@yandex.ru

Аудиогенная рефлекторная эпилепсия – это тяжелое неврологическое и системное заболевание, характеризующееся повторяющимися судорожными припадками, вызываемыми звуковыми сигналами. В данной работе рассматривается возможность влияния старения на эпилептогенез, и в связи с этим был проведен анализ функциональных и структурных изменений в дорсальном гиппокампе у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) в возрасте 18 месяцев, подверженных аудиогенной рефлекторной эпилепсии, по сравнению со здоровыми крысами линии Вистар того же возраста. Было показано, что у крыс линии КМ повышается как уровень экспрессии мРНК, так и уровень белка GAD67 – фермента синтеза ГАМК, в пирамидных клетках полей CA3 и CA4, stratum lucidum поля CA3, в хилусе и гранулярном слое гиппокампа по сравнению с контролем. Также у крыс линии КМ по сравнению с линией Вистар в пирамидных нейронах поля CA4 и гранулярном слое показано увеличение количества клеток, содержащих как Fra1, так и GAD67. В этих же областях клеток, содержащих только GAD67, у крыс линии КМ значительно меньше, что также свидетельствует об активации ГАМК-ергических нейронов. Другим маркером данного увеличения является выявленное нами снижение уровней как α -, так и β -субъединиц ГАМК А рецептора по сравнению с крысами линии Вистар при нормальном уровне экспрессии мРНК, что свидетельствует об увеличении связывания ГАМК рецепторами. Мы не наблюдали отличий в экспрессии и уровне белка NKCC1. При этом показано снижение уровня белка KCC2, но уровень фосфорилированной формы KCC2 повышался относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют о сохранении баланса хлора, следовательно, ГАМК действует как тормозный нейромедиатор. Ранее мы наблюдали подобное увеличение активности ГАМК-ергической системы у молодых интактных крыс линии КМ со сформированной судорожной готовностью по сравнению крысами Вистар соответствующего возраста. Таким образом, можно предположить, что у старых крыс линии КМ сохраняется повышенная активность тормозной ГАМК-ергической системы в гиппокампе.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-75-00060.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПОДОБНОГО ГЕНЕРАТОРА С НЕЙРОННЫМИ СЕТЯМИ ГИППОКАМПА МЫШИ

**Федулина А.А., Матвеева М.В., Бельтюкова А.В., Мальцева К.Е.,
Герасимова С.А., Лебедева А.В.**

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.
Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

fedulina@neuro.nnov.ru

В мире существуют нейродегенеративные заболевания, которые плохо поддаются медикаментозному лечению и требуют инвазивного вмешательства непосредственно в поврежденные структуры мозга, поэтому развитие прикладных медицинских исследований и методов восстановления нейронных связей с помощью электронных устройств является актуальным в настоящее время. Все чаще в клинических исследованиях используют электрическую стимуляцию мозга, которая приводит к усилению связей между нейронами, цепочки связей которых были повреждены вследствие травм или болезней. Это позволяет восстановить пластичность нейронных синапсов и улучшить состояние пациентов с неврологическими заболеваниями.

Разработка и развитие инвазивных технологий нейронных интерфейсов с замкнутым контуром позволили добиться больших успехов в восстановлении нейронных связей, поскольку имеют более тонкую и четкую настройку стимуляции, реагирующие на изменения физиологического состояния, что важно в процессе восстановления функций нервной ткани. Достижения в этих областях открывают перспективы для лечения широкого спектра заболеваний двигательной системы и нейродегенеративных заболеваний мозга.

Мы предлагаем биоэлектрическую нейрогибридную замкнутую систему, состоящую из радиотехнического генератора ФитцХью-Нагумо, живых переживающих срезов гиппокампа мозга мыши. Сигнал фиксировался с помощью системы регистрации и мониторинга функционального состояния биообъекта, а также осциллографа с функцией непрерывной записи сигнала. Мы провели эксперименты по сопряжению нейроноподобного генератора ФитцХью-Нагумо и биологических нервных клеток в замкнутом контуре при разных условиях. В результате удалось зафиксировать уменьшение частоты генерации генератора, что говорит о подстройке биообъектом параметров нейроноподобного генератора для поддержания своей жизнедеятельности. Данные результаты подтверждают работоспособность использования систем с замкнутым контуром при объединении живых и искусственных нейронов, однако требует дальнейших исследований для создания более физиологичных условий функционирования данной системы.

Исследование выполнено в рамках научной программы Национального центра физики и математики (проект «Искусственный интеллект и большие данные в технических, промышленных, природных и социальных системах»).

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЫШЕННУЮ СКЛОННОСТЬ К
НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС, АССОЦИИРОВАННУЮ С
ИЗМЕНЕНИЯМИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *CHRNA7* СТРУКТУРАХ
МЕЗОЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КРЫС

Фомичева А.А.¹, Сафарова Д.Н.¹, Стратилев В.А.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

st089749@student.spbu.ru

Введение. На сегодняшний день накоплено множество данных о наследственных факторах предрасположенности к аддикциям, а также получены убедительные доказательства существенной роли нарушений пренатального развития в формировании склонности к потреблению наркотических веществ. Анамнезы пациентов указывают на роль пренатальной гипоксии и стресса матери во время созревания мозга плода в формировании нарушений развития лимбической системы, но до сих пор не достигнуто понимание конкретных механизмов.

Целью настоящей работы была оценка влияния пренатальной гипоксии (ПГ) на склонность к потреблению никотина и выраженность синдрома отмены у взрослых крыс, а также анализ количества мРНК и белковой экспрессии никотинового ацетилхолинового рецептора 7 типа (*CHRNA7*) в структурах лимбической системы. Эксперименты проведены на взрослых 3-месячных самцах крыс линии Вистар, переживших ПГ (тяжелая гипобарическая гипоксия, 3 сеанса по 3 часа при 180 мм.рт.ст. с интервалами в 24 часа) на 14, 15 и 16-е сутки эмбрионального развития. Определяли склонность к потреблению никотина в условиях свободного выбора, а также выраженность аверсивного поведения в тесте избегания места после хронического стандартного двухнедельного введения никотина при помощи осмотических помп.

Крысы, пережившие ПГ, во взрослом возрасте отличаются повышенной склонностью к потреблению никотина в условиях свободного выбора. После хронического потребления никотина в отличие от контрольных животных демонстрируют признаки выраженной зависимости и синдрома отмены.

В гиппокампе (HPC) и префронтальной коре (PFC), структурах мозга, иннервирующих прилежащее ядро стриатума (NAc), ПГ крыс наблюдается снижение количества мРНК и белковой экспрессии *CHRNA7* по сравнению с контролем, в то время как в амигдале, структуре мозга, ингибирующей NAc, изменений экспрессии *CHRNA7* не выявлено. В NAc ПГ крыс суммарная белковая экспрессия *CHRNA7* не отличается от контроля, однако количество мРНК *chrna7* значительно превышает контрольные значения, что указывает на сниженную иннервацию глутаматергическими проекциями из префронтальной коры и гиппокампа и повышенную прямую рецепцию ацетилхолина ГАМК-ергическими клетками этой структуры мозга.

Таким образом можно заключить, что пренатальная гипоксия вызывает ослабление глутаматного эфферентного сигналинга стриатума, что вероятно компенсируется потреблением никотина и приводит к развитию симптомов зависимости.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №20-75-00003.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ НЕСПЕЦИФИЧНОЙ
Ca²⁺-ЗАВИСИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (mPTP) ПИРИДИНОВЫМИ
НУКЛЕОТИДАМИ СО СТОРОНЫ ЦИТОЗОЛЯ В МИТОХОНДРИЯХ
ПЕЧЕНИ, СЕРДЦА И ПОЧЕК КРЫС

Харечкина Е.С., Круглов А.Г.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

katya.kypri@gmail.com

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения ишемические повреждения органов являются главными причинами смертности, инвалидности и утраты трудоспособности в современном обществе. Установлено, что ключевым фактором, запускающим клеточную гибель органов при ишемия-реперфузионных повреждениях, является открывание неспецифической митохондриальной Ca²⁺-зависимой поры в митохондриях (mPTP). Данное явление приводит к увеличению проницаемости митохондриальных мембран для соединений массой ≤ 1.5 кДа, выходу апоптогенных факторов и запуску апоптоза или некроза. Соответственно, mPTP рассматривают в качестве мишени для предупреждения развития постишемических повреждений, а поиск ее регуляторов является перспективным направлением в современной биомедицине.

Ранее нами были идентифицированы новые мощные ингибиторы mPTP – пиридиновые нуклеотиды НАД⁺ и НАДН. В качестве объектов исследования были использованы изолированные митохондрии печени (RLM), кардиомиоциты и гепатоциты крыс. В рамках данного исследования мы продолжили изучение способности НАД(Н) ингибировать mPTP в изолированных митохондриях. Целью работы стало сравнение эффективности нуклеотидов в митохондриях печени, сердца (RHM) и почек крыс (RKM).

Митохондрии были получены из органов крыс линии Wistar стандартными методами дифференциального центрифугирования. Открывание mPTP определяли спектрофотометрически путем регистрации набухания митохондрий ($\lambda = 550$), а также путем измерения величины кальциевой емкости митохондрий с помощью Ca²⁺-селективного электрода.

Было обнаружено, что в RHM и RKM, аналогично RLM, НАДН и НАД⁺ оказывают ингибирующее действие на индукцию mPTP. При этом их эффект был также дозозависимым. Однако эффективность НАДН и НАД⁺ отличалась в зависимости от типа объекта. В идентичных условиях (концентрация белка = 1 мг/мл, концентрация кальция = 20 нмоль/мг белка) концентрации НАД(Н), вызывающие полумаксимальное ингибирование набухания митохондрий нуклеотидами (IC₅₀) были равны: 1004 ± 87 μМ (НАДН) и 2259 ± 120 μМ (НАД⁺) в RLM, 50 ± 12 μМ (НАДН) и 24 ± 4 μМ (НАД⁺) в RHM, 70 ± 14 μМ (НАДН) и 97 ± 19 μМ (НАД⁺) в RKM. Измерение кальциевой емкости также показало разную эффективность ингибиторного действия НАДН и НАД⁺. В концентрации 1 mM они увеличивали данный параметр в RLM в 2,3 (НАДН) и в 1,6 раз (НАД⁺), в RHM – в 6,5 (НАДН) и в 8,5 раз (НАД⁺), в RKM – в 6,9 (НАДН) и в 6,5 раз (НАД⁺). При этом стабилизация транспортера адениновых нуклеотидов АНТ (одного из предполагаемых структурных компонентов mPTP) в «с»-конформации (при добавлении специфического ингибитора карбоксиатрактилозида) отменяло/снижало защитное действие НАД(Н), оказываемое на все типы митохондрий.

Таким образом, наиболее чувствительными к действию НАД(Н) органами являются сердце и почки. Митохондрии данных органов могут являться перспективными мишенями при разработке терапии ишемия-реперфузионных повреждений, основанной на подавлении mPTP через НАД(Н)-связывающий сайт. Тканеспецифичный эффект НАД(Н) может свидетельствовать о разном уровне экспрессии НАД(Н)-зависимого регулятора mPTP в разных органах. Наиболее подходящими кандидатами на роль данного белка являются изоформы АНТ.

Работа поддержана грантом РНФ №22-74-00025.

ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ЭШЕРИХИОЗА У БЕСПОРОДНЫХ МЫШЕЙ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА НАТРИЕВОЙ СОЛИ, ОБРАБОТАННОЙ ИМПУЛЬСНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ

Цай А.А.¹, Роденко Н.А.^{1,2}, Васильева Т.И.¹

¹Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева,
Самара, Россия

²Самарский ФИЦ РАН, Самара, Россия

annatsay2001@mail.ru

Воздействия магнитными полями высокой интенсивности на молекулы веществ изучены недостаточно. Например, исследование обработанных магнитным полем молекул лекарственных веществ и их взаимодействие с живым организмом может способствовать развитию новых способов терапии и совершенствованию методик лечения различных заболеваний.

Оценку эффективности антибиотикотерапии при моделировании эшерихиоза у мышей в результате использования бензилпенициллина натриевой соли, обработанной импульсным магнитным полем (ИМП), проводили в Самарском государственном аграрном университете на кафедре эпизоотологии, патологии и фармакологии.

В исследовании использовался порошок бензилпенициллина натриевой соли (Агрофарм, Россия). Обработка порошкообразного антибиотика ИМП осуществлялась на магнитно-импульсной установке, созданной в Самарском университете. Воздействие ИМП на антибиотик производилось однократными импульсами со следующими параметрами: напряженность магнитного поля $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м при частоте $f=40$ кГц. Исследования осуществлялись в условиях *in vivo* на 60 мышах, разделенных на 4 группы: не зараженные и зараженные штаммом *E. coli M17* (НПО Микроген, Россия); контрольная группа, которая получала лечение с антибиотиком без обработки ИМП; опытная группа, которая получала лечение с облученным ИМП антибиотиком. Введение бензилпенициллина натриевой соли (100000 ЕД) осуществляли подкожно по 0,2 мл три раза в сутки в течение нескольких суток.

Для оценки эффективности использования обработанного ИМП антибиотика проводились гематологические, биохимические исследования, оценивалась микробная обсемененность внутренних органов.

При лечении антибиотиком после обработки ИМП выявлено повышение уровня лейкоцитов в крови мышей через 3 суток после лечения на 34%, в контрольной группе – на 30% по сравнению с фоновым показателем до заражения. Через 6 суток после лечения в опытной группе животных общее количество лейкоцитов выросло на 78%, в контрольной группе достоверных отличий не было. На 3 сутки количество лимфоцитов в опытной группе увеличилось в 2,3 раза, а на 6 сутки – в 2,8 раз, в контрольной группе достоверных изменений содержания лимфоцитов в крови не обнаружено.

После лечения достоверно снижалась активность аланинаминотрансферазы, аспаргатаминотрансферазы (АСТ) и γ -глутамилтрансферазы, но интенсивнее снижение происходило в контрольной группе. Активность АСТ достоверно была выше в опытной группе на 34%, относительно значений контрольной группы мышей.

Оценка микробной обсемененности после лечения показала, что применение антибиотика после воздействия ИМП показывает более эффективные результаты, но только на первые сутки лечения. Было зафиксировано снижение темпа размножения *E. coli* по сравнению с использованием антибиотика без воздействия ИМП, на третьи и четвертые сутки наблюдается обратная картина.

Лечебная эффективность обработанного ИМП антибиотика требует дальнейших исследований в направлении оценки субхронической токсичности обработанного антибиотика на функционирующие системы организма.

АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО КАНАЛА TRPC3 МЫШИ В ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ

Черкашин А.П., Рогачевская О.А.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный
центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

a.p.cher@yandex.ru

Вкусовые клетки имеют биполярную морфологию, а рецепторный аппарат, отвечающий за восприятие вкусовых стимулов, сосредоточен на их апикальной мембране. Площадь апикальной части мембраны составляет не более 10% от общей площади клеточной мембраны, поэтому рецепторы и ионные каналы, участвующие в детекции вкусовых стимулов, составляют минорную часть поверхностных рецепторных белков всей клетки. Это затрудняет как их идентификацию, так и изучение их физиологических характеристик, поскольку вклад в клеточный ответ этих минорных молекул может нивелироваться сигналами, сгенерированными другими рецепторами. Задача исследования функциональных характеристик белка интереса может быть решена с помощью его гетерологической оверэкспрессии.

По аналогии с обонятельной системой мы предположили, что в генерации ответов на вкусовые стимулы клетками типа II участвуют DAG-активируемые Ca^{2+} -проницаемые каналы из семейства TRPC. С помощью экспрессионного анализа во вкусовой ткани мыши были идентифицированы ионные каналы TRPC1, -3, -4, -5, из которых DAG-активируемым каналом

является только TRPC3. Исследование активности канала TRPC3 в одиночных вкусовых клетках не дало однозначных результатов. В связи с этим канал TRPC3 был клонирован нами из вкусовой ткани мыши в вектор, обеспечивающий экспрессию рекомбинантного белка TRPC3, слитого с зеленым флуоресцентным белком GFP. Полученный плазмидный вектор встраивали в клетки HEK293, через 24 – 72 часа после трансфекции клетки HEK293/TRPC3 оценивали визуально с помощью конфокальной микроскопии. По флуоресценции GFP было установлено, что только у 5% трансфицированных клеток канал TRPC3 локализован в плазмалемме, тогда как у подавляющего большинства – в цитозоле. По аналогии с клетками вомероназального органа мы предположили, что для эффективного транспорта канала TRPC3 в мембрану необходимо наличие в экспрессионной системе транспортерного белка RTP1. И действительно, трансфекция клеток HEK293 плазмидами, содержащими TRPC3 и RTP1, привела к увеличению числа клеток, в которых канал находился в мембране.

Электрофизиологические эксперименты на клетках HEK293/RTP1/TRPC3 показали наличие токов, характерных для каналов TRPC3. Амплитуда этих токов увеличивалась в присутствии аналога DAG (OAG), так же стимуляция клеток OAG приводила к генерации Ca^{2+} -ответов, что свидетельствует о правильной сборке и функционировании канала TRPC3 на мембране клеток HEK293. Клетки HEK293/TRPC3/RTP1 демонстрировали зависимость токов и Ca^{2+} -сигналов от ингибитора канала TRPC3 (Pyr 10) и его активатора (GSK 1702934A). Таким образом, полученные нами клетки HEK293/RTP1/TRPC3 являются адекватным инструментом для исследования функциональных характеристик канала TRPC3.

Работа поддержана грантом РФФ 22-14-00031.

СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО И ЭНДОГЕННОГО 2-AG НА СЕКРЕЦИЮ МЕДИАТОРА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ РАЗНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА

Чернышев К.А., Богачева П.О., Тарасова Е.О., Балезина О.П.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

cherkir2000@yandex.ru

В моторных синапсах распространена регуляция синаптической передачи с участием разнообразных ретроградных мессенджеров. К таким мессенджерам относятся, в частности, особые липофильные молекулы – эндоканнабиноиды. В скелетных мышцах обнаружены ферменты синтеза и деградации эндоканнабиноидов и показана возможность их высвобождения в ответ на синаптическую активность. Также известно, что уровень эндоканнабиноидов повышается в ответ на травмы и воспаление в нервной системе. Какие влияния это может оказывать на нервно-мышечную передачу сигнала – оставалось не изученным.

В данной работе сравнивали эффекты наиболее распространенного у млекопитающих эндоканнабиноида 2-арахидоноилглицерола (2-AG) при его экзогенной аппликации и при эндогенном выбросе в зрелых и новообразованных после травмы нерва моторных синапсах мышцы.

С помощью стандартного микроэлектродного метода регистрировали одноквантовые миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные стимуляцией нерва многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП).

В функционально зрелых моторных синапсах экзогенный 2-AG (1 мкМ) вызывал увеличение амплитуды МПКП и ПКП, но не квантового состава ПКП. Этот эффект полностью предотвращался в присутствии обратного агониста каннабиноидных рецепторов СВ1 типа AM251 (1 мкМ), показывая, что 2-AG действовал специфически, путем активации СВ1 рецепторов. Повышение уровня эндогенного 2-AG создавали при помощи ингибитора фермента его деградации, моноацилглицероллипазы, JZL-184 (1 мкМ). JZL-184 воспроизводил эффекты экзогенного 2-AG и вызывал прирост амплитуды МПКП и ПКП без изменения квантового состава ПКП. Данный прирост также предотвращался блокированием СВ1-рецепторов при помощи AM251.

Таким образом, и экзогенный и эндогенный 2-AG оказывали сходное потенцирующее влияние на передачу сигналов в зрелых, здоровых моторных синапсах.

В новообразованных синапсах, находящихся на ранней стадии регенерации после денервации мышцы, экзогенный 2-AG (1 мкМ) тоже оказался способен усиливать передачу сигналов и увеличивать амплитуду МПКП и ПКП, не затрагивая количество секретируемых квантов. Повышение уровня эндогенного 2-AG в новообразованных синапсах путем инкубации с JZL-184 (1 мкМ) приводило к повторению эффектов экзогенного 2-AG. Действие эндоканнабиноида было рецептор-специфичным, так как предотвращалось при помощи AM251 (1 мкМ) как при экзогенной аппликации 2-AG, так и на фоне действия JZL-184.

По итогам работы было продемонстрировано одинаковое влияние и экзогенного, и эндогенного 2-AG как в зрелых, так и в новообразованных моторных синапсах мыши. Это влияние выражалось в усилении спонтанной и вызванной секреции медиатора и было опосредовано активацией каннабиноидных рецепторов СВ1 типа.

Работа поддержана грантом РФФ 23-25-00065

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИМФОЦИТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА

Чурсанова Е.Н., Деенкова А.Ю., Шестых В.А., Наквасина М.А.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Eka.bio@mail.ru

В настоящее время внимание исследователей привлекает проблема взаимосвязи процессов апоптоза, клеточного старения и функционирования теломеразы. В этой связи нами были исследованы структурно-функциональные модификации лимфоцитов человека в условиях воздействия индуктора апоптоза – пероксида водорода (10^{-5} моль/л)– в присутствии активатора теломеразы – ресвератрола в концентрациях 10^{-3} - 10^{-6} моль/л.

Установлено, что воздействие пероксида водорода на суспензию лимфоцитов, с их последующей инкубацией в течение 1 и 2 ч при 37 °С, индуцирует статистически значимое повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в цитозоле по сравнению с таковым для нативных клеток. В присутствии ресвератрола выявлено существенное снижение уровня АФК в лимфоцитах, наиболее выраженное при его концентрации 10⁻⁶ моль/л, по отношению к величине изучаемого параметра для клеток, модифицированных пероксидом водорода в отсутствие фитоалексина. С помощью метода хемиллюминолзависимой люминесценции в модельной системе обнаружена антирадикальная активность ресвератрола (10⁻⁶ моль/л) по отношению к пероксиду водорода. Установлено, что инкубация лимфоцитов с ресвератролом в концентрациях 10⁻⁴-10⁻⁶ моль/л индуцирует значительное повышение по сравнению с контролем (интактные клетки) уровня каталитической активности каталазы, расщепляющей пероксид водорода, и глутатионредуктазы, восстанавливающей окисленный глутатион, в цитозоле иммуноцитов.

С использованием флуоресцентного зонда анилинонафталинсульфоната показано, что добавление ресвератрола (10⁻⁴ моль/л) к суспензии клеток до их обработки пероксидом водорода препятствует изменениям зарядового состояния их плазматических мембран, зарегистрированным после воздействия пероксида водорода. Ресвератрол (10⁻⁴-10⁻⁶ моль/л) способствует сохранению и повышению по сравнению с контролем уровня жизнеспособности интактных и модифицированных пероксидом водорода лимфоцитов после их инкубации в течение 2 часов.

Следовательно, ресвератрол проявляет протекторное действие по отношению к лимфоцитам человека в условиях инициации апоптоза, индуцированного пероксидом водорода, которое обусловлено его антиоксидантными свойствами.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ С1473G В ГЕНЕ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ 2 (*TRH2*) НА СМЕРТНОСТЬ И МАССУ ТЕЛА ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ

Шишкова У.Д.^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

u.shishkova@g.nsu.ru

Серотонин (5-НТ) регулирует эмбриональное развитие. Триптофангидроксилаза 2 (*Tph2*) – ключевой фермент синтеза 5-НТ, определяющий уровень медиатора в нервной системе. Мыши с нокаутом гена *Tph2* характеризуются замедленным развитием. Мутация С1473G в гене *Tph2*, приводящая к замене Р447R в молекуле фермента, вдвое снижает активность *Tph2* в мозге мышей.

Целью данной работы является исследование влияния мутации С1473G в гене *Tph2* на смертность и массу тела эмбрионов мышей. опыты проводились на мышях двух конгенных линий В6-1473СС и В6-1473GG, имеющих общий генетический бэкграунд и различающихся только аллелями полиморфизма С1473G и их гибридах первого поколения В6-1473CG. Были проведены следующие скрещивания: В6-1473СС x В6-1473СС, В6-1473СС x В6-1473GG, В6-1473GG x В6-1473СС, В6-1473CG x В6-1473CG, в которых у 19-дневных эмбрионов от этих

скрещиваний были исследованы генотипы и массы тела. Соотношения генотипов эмбрионов в скрещиваниях В6-1473СС x В6-1473GG, В6-1473GG x В6-1473СС, В6-1473CG x В6-1473CG соответствовали классическому Менделевскому расщеплению. Не выявлено различий по массе тела у эмбрионов с генотипами В6-1473СС, В6-1473CG, В6-1473GG.

Таким образом, полиморфизм С1473G и наследственно детерминированная изменчивость активности Trp2 не влияет существенно на выживаемость и массу тела эмбрионов мышей.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00035

МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ ПРИ РАЗВИТИИ И ЛЕЧЕНИИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Шкляр А.А.^{1,2}, Никулич И.Ф.², Фурсова А.Ж.², Кожевникова О.С.²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

shklyarlesh@gmail.com

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – это сложное многофакторное глазное заболевание, являющееся основной причиной потери центрального зрения у людей старше 60 лет. Её скорость прогрессии и тип развития контролируются множеством взаимодействующих факторов. К их числу относятся и эпигенетические механизмы, включая изменения экспрессии микроРНК. Оценка циркулирующего пула микроРНК рассматривается как перспективный подход к диагностике ВМД. На данный момент стандартным лечением ВМД является интравитреальное введение ингибиторов VEGF. Несмотря на доказанный терапевтический эффект данной терапии, по разным оценкам от 15 до 30% пациентов показывают недостаточный ответ на лечение. Целью исследования является поиск перспективных микроРНК, которые можно использовать в качестве маркеров для диагностики и оценки эффективности лечения ВМД.

Мы оценили уровень 179 микроРНК перед началом терапии в плазме крови пациентов, относящихся к трём группам: 1) наличие ответа на терапию, 2) отсутствие ответа на терапию и 3) контрольная группа без патологий глазного дна. Для оценки уровня микроРНК использовали метод RT-qPCR. Было выявлено 11 микроРНК, ассоциированных с ответом на терапию. В том числе у пациентов, у которых отсутствовал ответ на терапию, наблюдали значимое увеличение уровня miR-27a и miR-23b, участвующих в регуляции ангиогенеза и развитии сосудов сетчатки. Так же у пациентов, у которых наблюдали ответ на терапию, был значительно понижен уровень miR-532. Были выявлены изменения экспрессии 6 микроРНК, связанных с риском развития ВМД (miR-20a, miR-21, miR-23b, miR-27a, miR-29a, miR-140). Для определения диагностических возможностей микроРНК мы оценили изменения экспрессии кандидатных микроРНК в сетчатке крыс. Анализ показал увеличение уровня miR-27a у крыс линии OXYS – признанной модели ВМД – по мере развития ретинопатии, аналогичной ВМД, по сравнению с контрольными крысами Вистар, что может свидетельствовать о потенциале этой микроРНК в качестве маркера прогрессии ВМД.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ №21-15-00047.

ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ И КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ НА РАЗВИТИЕ ФИБРОЗА ПОЧКИ ПОСЛЕ УНИЛАТЕРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

Якупова Э.И.¹, Семенович Д.С.¹, Абрамичева П.А.¹, Бочарников А.Д.², Плотников Е.Ю.¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Минздрава РФ, Москва, Россия

yakupova.mira@mail.ru

Почечный фиброз (ПФ) является проявлением хронической болезни почек, которое в конечном итоге приводит к терминальной стадии почечной недостаточности, требующей диализа или трансплантации почки. Известные доступные методы лечения ПФ в настоящее время ограничены. Воздействие на метаболизм может положительно влиять на некоторые патологические процессы. В этой работе мы исследовали влияние ограничения калорийности питания (ОКП) и кетогенной диеты (КД) на развитие ПФ спустя месяц после односторонней ишемии/реперфузии (И/Р) у мышей, а также проанализировали сопутствующие изменения метаболизма.

Было выявлено, что И/Р почки сопровождается увеличением содержания таких маркеров фиброза как гидроксипролин и увеличением экспрессии мРНК генов *Colla1*, *TGF-β1*, *Timp2*. Подобные эффекты были показаны для мышей с И/Р и КД. При ОКП же не наблюдалось увеличения экспрессии мРНК *Colla1*, но было обнаружено увеличение экспрессии α-SMA на уровне белка. Кроме того, ОКП сопровождалось самыми высокими изменениям показателей крови как: снижение в 2 раза уровня глюкозы, увеличение в 4 раза содержания кетоновых тел, снижение в 1,5 раза содержания лактата, снижение показателя общих липидов и уровня триглицеридов.

ОКП сопровождалось отменой вызванного И/Р снижения активности сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы без влияния на гликолиз. Аналогичные результаты были показаны для КД, которая дополнительно восстанавливала активность α-кетоглутаратдегидрогеназы, а также приводила к снижению активности фосфофруктокиназы.

Таким образом, наше исследование показывает, что ОКП и КД вызывает некоторые метаболические изменения в ткани почки спустя месяц после И/Р, но не снижает развитие фиброза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 21-75-30009.

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ В ВЫРАБОТКЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ *SOLANUM LYCOPERSICUM* К УФ-В ИЗЛУЧЕНИЮ

Абрамова А.А.¹, Пашковский П.П.²

¹Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия

²Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

ann.kiedis2000@gmail.com

Свет является одним из основополагающих факторов внешней среды, оказывающий непосредственное влияние на рост и синтез метаболитов. Интенсивность света и его спектральный состав при помощи фоторецепторов воздействуют на дифференцировку хлоропластов. Это способствует контролю фотосинтетической активности. Свет контролирует развитие растений при помощи сложного сигнального каскада, в который помимо фоторецепторов вовлечены транскрипционные факторы (ТФ), киназы, кальмодулин, АФК и другие компоненты. Одними из ключевых фоторецепторов являются фитохромы, криптохромы, а также рецепторы УФ-В.

Растение испытывает одновременное воздействие нескольких факторов. В естественных условиях в определенный момент интенсивность света может достигать высоких значений ($2000 \mu\text{mol}$ (квантов) m^2s^{-1}), а процент УФ до 7 % от общего излучения. Диапазон УФ-В (315–280 нм) представляет наименьшую часть солнечного света, однако оказывает существенное воздействие на растения посредством высокой энергии квантов УФ-В, а также немаловажного регулирующего воздействия его спектральной области. Фотосистема II (ФСII) является одним из самых чувствительных клеточных элементов к воздействию УФ-В. Кроме того, УФ-В может стимулировать развитие специфических защитных механизмов фотосинтетического аппарата, которые функционируют через фоторецептор UVR8 (UV-B RESPONSE LOCUS 8), криптохромы и неспецифические механизмы, например через фитохромную систему. Под действием УФ-В-излучения растения вырабатывают совокупность вторичных метаболитов, таких как антоцианы, флавоноиды, фенольные кислоты, которые являются немаловажными показателями устойчивости растений к УФ-В. Вдобавок к защитным функциям антоцианы и фенольные соединения обладают высокими питательными характеристиками.

В связи со всем вышеперечисленным в нашей работе изучали воздействие УФ-В ($10 \mu\text{mol}$ (квантов) m^2s^{-1}) на листья фоторецепторных мутантов томата (*phya*, *phyb1*, *phyb1b2*, *cry1*), определяли показатели первичных процессов фотосинтеза (Y(II), Fv/Fm, NPQ, qL, и Y(NPQ)), а также состав основных фотосинтетических пигментов, антоцианов и сумму неферментативных антиоксидантов (ТЕАС). Обнаружили восприимчивые к кратковременному воздействию УФ-В мутанты (*phyb1b2* и *cry1*), которые показали наиболее сильное снижение индексов максимального и эффективного квантового выхода, на фоне увеличения нефотохимического тушения NPQ. У восприимчивых мутантов обнаружено уменьшение показателей активности неферментативных антиоксидантов, а также увеличение содержания хлорофиллов.

Мы предполагаем, что фитохром В1, а также CRY1 вовлечены в световой сигналинг и адаптацию растений томата к воздействию УФ-В. Накопление низкомолекулярных антиоксидантов и пигментов после облучения УФ-В может увеличить их содержание в готовой продукции либо позволит получать продукцию с особыми биохимическими и/или физиологическими характеристиками.

Исследование флуоресцентных параметров фотосинтеза выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 22-74-10086).

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОСТА И УРОЖАЙНОСТИ У КОНТРАСТНЫХ ПО ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ПРАЙМИРОВАНИИ БАКТЕРИЯМИ-ЭНДОФИТАМИ *BACILLUS SUBTILIS* И ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА И ЗАСУХИ

Автушенко И.А.^{1,2}, Якупова А.И.^{1,2}, Ласточкина О.В.¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского
научного центра РАН, Уфа, Россия

²Уфимский институт науки и технологий, Уфа, Россия

iravtuschenko@mail.ru

Засуха и комбинация засухи с другими стресс-факторами, включая эффект от применения гербицидов, приводят к значительным потерям урожая и снижению качества зерна пшеницы. Ростстимулирующие бактерии *Bacillus subtilis* рассматриваются как перспективный биологический подход для защиты растений от различных стресс-факторов окружающей среды. Цель данной работы заключалась в изучении влияния праймирования семян эндофитными бактериями *B. subtilis* 10-4 и 26Д на ростовые процессы и урожайность контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы в норме, при воздействии гербицидного прессинга и засухи, а также в пост-стрессовый период. Вегетационные опыты проводились на растениях *Triticum aestivum* L. (засухоустойчивый сорт Экада70 и засуховосприимчивый сорт Салават Юлаев) в контролируемых условиях в сосудах с почвой. Семена перед посевом замачивали (1 час) в суспензиях *B. subtilis* 10-4 (10⁵ КОЕ/мл), *B. subtilis* 26Д (10⁸ КОЕ/мл) или воде (контроль) и выращивали в сосудах с почвой. Почвенную засуху моделировали через 72 часа после опрыскивания 16-сут растений гербицидом Секатор Турбо (Байер, Германия) путем приостановки полива растений на 7 дней (до достижения дефицита воды, на 60% ниже нормы) с последующим возобновлением нормального полива. Морфо-физиологическую оценку состояния растений проводили в динамике: 1) до воздействия стресс-факторов (16-сут растения, фаза 2-3 листа); 2) через 4 дня воздействия засухи; 3) через 7 дней воздействия засухи; 4) через 4 дня после возобновления нормального полива (репарация).

Выявлено, что в нормальных условиях произрастания праймирование штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26Д в разной степени увеличивало (на 10-50%) интенсивность ростовых процессов растений обоих сортов (длину наземной части и корней, их сырую и сухую биомассу) на протяжении всего периода вегетации. При этом, при применении штамма 10-4 (в сравнении с штаммом 26Д) наблюдалось более заметное увеличение длины корней растений, в особенности сорта Экада70. Отдельное применение только гербицида не оказало существенного влияния на рост растений обоих сортов, тогда как воздействие почвенной

засухи и комбинации гербицид+засуха приводило к торможению интенсивности роста обоих сортов пшеницы. Это нашло отражение в уменьшении длины побегов и корней растений, их сырой и сухой биомассы, а также в снижении показателей урожайности (длины колосьев, числа и массы зерен). Установлено, что применение штаммов *B. subtilis* 10-4 и 26Д (для которых была выявлена устойчивость к индуцированному ПЭГ-6000 (засуха) и гербицидом Секатор Турбо стрессам) снижало в разной степени (до 40-50%) уровень негативного воздействия засухи и комбинации гербицид+засуха на рост растений обоих сортов (длину наземной части и корней, их сырую и сухую биомассу). А также способствовала более быстрой репарации (восстановлению) роста растений в пост-стрессовый период (после возобновления нормального полива) и формированию улучшенных показателей урожайности в сравнении с контрольными небактеризованными растениями. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее выраженный защитный эффект для растений сорта Экада70 наблюдался при применении штамма 10-4, а для сорта Салават Юлаев при применении штамма 26Д.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-26-00076.

ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ мтДНК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Алимова А.А.^{1,2}, Гуреев А.П.^{1,2}, Попов В.Н.^{1,2}

¹Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

aa10022607@gmail.com

Пестициды представляют собой химические соединения, используемые для борьбы с сорняками, насекомыми-вредителями, а также с патогенными грибами. С ростом населения планеты выросло и количество используемых пестицидов. В настоящее время большая часть пестицидов имеет ограниченную избирательность, и хорошо установлена их токсичность на нецелевые организмы, в том числе рыб, птиц и насекомых-опылителей. Хорошо установлено, что одной из основных мишеней для пестицидов являются митохондрии. Влияние пестицидов на митохондрии растений изучено значительно меньше. В своем исследовании мы предполагали, что повреждения мтДНК в растениях можно использовать как маркер окислительного стресса у сельскохозяйственных растений.

Мы показали, что в изолированных митохондриях растений *in vitro* различные пестициды могут ингибировать работу некоторых комплексов ЭТЦ, в частности комплекса I, II, IV и АТФазу, и разобщать сопряженное митохондриальное дыхания. Также некоторые пестициды значительно увеличивают скорость продукции АФК. В проводимых нами экспериментах *in vivo* мы исследовали влияние гербицида метрибузина и инсектицида имидаклоприда на мтДНК в вегетативных частях и клубнях. Нами было показано, что в побегах картофеля в 4 генах из 6 изучаемых генов наблюдалось пестицид-индуцируемое снижение количества повреждений мтДНК. При этом в полевом эксперименте было зафиксировано незначительное увеличение количества повреждений в мтДНК. В подобном

эксперименте с томатами мы использовали фунгицид дифеноконазол. Здесь нами было зафиксировано увеличение количества повреждений мтДНК в побегах томатов, обработанных дифеноконазолом. Однако в полевом эксперименте не было обнаружено влияние дифеноконазола на количество повреждений мтДНК. Также нами были обработаны проростки пшеницы растворами тиометоксама, пропиконазола, ципроконазола, дифеноконазола, клопирамида, лямбда-цигалотрина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мтДНК молодых побегов пшеницы наиболее подвержена повреждению при воздействии дифеноконазола и пропиконазола. В целом наши исследования показывают, что молодые побеги сельскохозяйственных растений в большей степени подвержены повреждениям, чем плоды и клубни растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 23-24-00277).

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*FRAXINUS EXCELSIOR* L.)

Аминева Е.Ю.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и
биотехнологии, Воронеж, Россия

elena.pardaeva@mail.ru

Ясеньевые насаждения на территории Российской Федерации занимают свыше 700 тыс. га. В последние десятилетия происходит их массовая деградация и гибель в силу распространения вредителей и инфекций ясеня по всему миру. Проведение работ по клональному микроразмножению ясеня будет способствовать его сохранению и восстановлению.

Цель исследования – оптимизация состава питательных для введения в культуру *in vitro* взрослых деревьев ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.). В качестве эксплантов использовали сегменты молодых зеленых побегов взрослых деревьев ясеня обыкновенного. Стерилизацию эксплантов проводили общепринятым способом с применением в качестве стерилизующих агентов раствора коммерческого моющего средства «Domestos» и раствора мертиолята. Для введения в культуру *in vitro* апробированы варианты питательных сред, где за основу были взяты среды WPM (Woody Plant Medium), DKW (Driver-Kunijuki Walnut medium), MS (Murashige and Skoog medium) в сочетании с регуляторами роста 6-БАП (6-бензиламинопурин) и ИМК (индолилмасляная кислота) в различной концентрации.

В результате наиболее удачными вариантами для инициации побегообразования оказались среды DKW и MS. Однако показатели на среде DKW ниже относительно MS: 73,1±7,9% против 85,4±6,8%. Худшим вариантом, по нашим данным, является среда WPM: количество эксплантов, сформировавших побег, составило всего лишь 8,7±3,1%. Об эффективности состава питательной среды также судили по высоте сформировавшихся побегов. Оценку вели на 21 сутки культивирования. К этому времени экспланты на питательной среде WPM погибали. Лучшие результаты были получены также на среде MS: здесь высота побега в среднем достигала 4,5±1,9см.

На данном этапе нашего исследования из четырех испытанных вариантов питательных сред для введения в культуру *in vitro* ясеня мы рекомендуем питательную среду следующего состава: MS + 4,0 мг/л БАП + 0,01 ИМК, так как именно на ней отмечалось лучшее побегообразование, и была зафиксирована наибольшая высота побегов.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СВЕРХЭКСПРЕССИИ *GMESR1* НА СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ У *MEDICAGO TRUNCATULA*

Артемюк А.М.¹, Творогова В.Е.¹, Лутова Л.А.¹, Jiao Y.²

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²Peking University, Beijing, China

nastyart2004@gmail.com

Соматический эмбриогенез (СЭ) – образование эмбрионов из соматических клеток растения. Этот процесс широко используется в биотехнологии для трансформации растений, их размножения, а также для изучения процессов регенерации и зиготического эмбриогенеза. Однако не все виды и сорта растений способны к образованию соматических эмбрионов, поэтому поиск регуляторов и стимуляторов СЭ является важной задачей для биотехнологии.

Мы исследуем влияние сверхэкспрессии гена сои (*Glycine max*) *ESR1*, а также ближайшего его гомолога у *Medicago truncatula* – *ERF74*, на СЭ в *Medicago truncatula*. Эти гены кодируют транскрипционные факторы из группы AP2/ERF, и для их ортолога, гена *ESR1 Arabidopsis thaliana*, показано стимулирующее действие на регенерацию побегов. Мы предполагаем, что гены *ESR* сои или люцерны могут стимулировать СЭ у бобовых.

Для упрощения поиска регуляторов соматического эмбриогенеза мы также разрабатываем систему культивации эксплантов в жидкой среде для трансформации и образования соматических эмбрионов для *Medicago truncatula*. В отличие от твердой среды, использование которой более распространено, трансформация в жидкой должна позволить использовать в качестве эксплантов черешки, упростить обновление среды, а также заменить одноразовые ёмкости для культивирования на многоразовые.

Согласно нашим предварительным результатам, концентрация селективного агента (гигромицина) должна быть снижена для жидкой среды по сравнению с твердой.

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ИОНАМИ ^{12}C НА ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И КОНЦЕНТРАЦИЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ У ЯЧМЕНЯ ПОСЕВНОГО

Астахина С.О., Комарова Л.Н.

Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия

astakhina@list.ru

В интегральном потоке галактических космических лучей (ГКЛ) наиболее представлены ядра с энергиями в диапазоне 300-500 МэВ/нуклон.

Для биологической характеристики источника ускоренных ионов углерода, необходимой для моделирования радиационных последствий при межпланетных космических полетах, требуется определение коэффициентов относительной биологической эффективности (ОБЭ).

Цель работы – изучение влияния облучения тяжелыми ионами ^{12}C в дозах 1, 2, 4 и 6 Гр на длину ростка и главного корня, а также концентрации основных фотосинтетических пигментов у пророщенных семян ячменя посевного. Для эксперимента был выбран сорт Ладный. Облучение семян ионами ^{12}C проводили на базе Института физики высоких энергий (ИФВЭ) ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт» (г. Протвино) на каскаде ускорителя «У-70» на «простреле» со средней энергией 450 МэВ/нуклон. После облучения семена проращивались в рулонных культурах по 30 семян в термостате, на 5 день проращивания помещали культуры под фитолампу. На 7 сутки измеряли длину ростка и главного корня. На 10 сутки фотометрическим методом измеряли концентрации хлорофилла-а, хлорофилла-б и каротиноидов в проростках ячменя посевного.

У проростков ячменя сорта Ладный при всех изученных дозах облучения статистически значимых изменений длины ростков и главных корней по сравнению с контролем выявить не удалось. Однако, отмечено дозозависимое снижение концентраций фотосинтетических пигментов: хлорофилла-а (при 1, 2, 4 и 6 Гр на 14, 19, 29 и 36% соответственно), хлорофилла-б (на 11, 23, 25 и 27% соответственно), каротиноидов (на 14, 21, 33 и 41% соответственно).

Величина ОБЭ зависит не только от физико-технических факторов (линейной потери энергии, состава и однородности пучка и др.), но и биологических параметров – вида, метода регистрации повреждений, концентрации кислорода в тканях, стадии клеточного цикла и др. Ранее мы исследовали влияние гамма-излучения на содержание фотосинтетических пигментов, поэтому на основе обобщенных результатов вычислили значения ОБЭ ионов ^{12}C при облучении «на простреле» для семян ячменя посевного – $0,78 \pm 0,02$.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИОНОВ РТУТИ НА СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* ОБРАЗОВЫВАТЬ КОЛОНИИ

Афонин А.А., Ляпунова Е.Р., Комарова Л.Н.

Обнинский институт атомной энергетики — филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия

afonin.alekse@gmail.com

Ионизирующее излучение оказывает сложное и многокомпонентное воздействие на живые организмы. Кроме прямого действия, выражающегося в повреждении чувствительных структур клеток, имеет место также косвенное воздействие радиации, связанное с образованием радиотоксинов – заряженных ионов, радикалов, высокоактивных веществ перекисного типа. При накоплении радиотоксинов в клетках изменяется проницаемость клеточных стенок, смещается ход биохимических и физиологических процессов в организме.

В реакции живого вещества на облучение задействованы сложные системы репарации повреждений, управляемые ферментами и некоторыми другими химическими веществами. Эта система позволяет до определенного предела поддерживать жизнеспособность организмов, несмотря на увеличение дозы. Дальнейшее увеличение дозы приводит к перегрузке и срыву работы защитных механизмов, возникает ряд побочных заболеваний, появляются летальные исходы.

Загрязнение окружающей среды тяжёлыми металлами – одна из актуальных проблем современного мира. Попадая в водоемы, тяжелые металлы оказывают токсическое действие на фитопланктон, который является первичным звеном в системе пищевых связей водных организмов и определяет состояние водной экосистемы в целом. Наиболее опасными для окружающей среды являются ртуть и ртутьсодержащие соединения.

Облучение проводили на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (ФГБНУ ВНИИРАЭ), на уникальной научной установке «ГУР-120». Мощность дозы облучения – 58 Гр/ч. Эффекты действия оценивали по способности хлореллы образовывать микроколонии.

Проведенные исследования показали, что под действием ионов ртути в концентрации 1 ПДК количество колоний, в которых более 10 клеток, уменьшается практически в 3 раза, а количество клеток погибших без деления увеличивается в 1.6 раз. Данный эффект можно объяснить взаимодействием ртути с белками цитоскелетных микротрубочек, что вызывает угнетение внутриклеточной подвижности, транспорта частиц, а также неправильное расхождение хромосом при делении клеток.

После облучения хлореллы гамма-квантами в дозе 100 Гр количество колоний, в которых более 10 клеток, уменьшается в 2 раза, а количество клеток погибших без деления увеличивается в 1.25 раз. Это может быть связано с временной задержкой первого пострадиационного деления в связи с «попытками» клеток репарировать появившиеся повреждения. В этом случае происходит уплотнение ядерного вещества, которое проявляется сморщиванием ядра, после чего клетка погибает, так и не поделившись.

При комбинированном действии ионов ртути в концентрации 1 ПДК и гамма-излучения в дозе 100 Гр количество колоний, в которых более 10 клеток, уменьшается лишь на 4% относительно контроля, а количество клеток погибших без деления значимо не изменяется.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ C_{40} КАРОТИНОИДОВ С 3-13 СОПРЯЖЕННЫМИ ДВОЙНЫМИ СВЯЗЯМИ: ТУШЕНИЕ И ГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Ашихмин А.А.¹, Бендикс А.С.², Большаков М.А.¹, Красновский А.А. мл.²

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Москва, Россия

ashikhminaa@gmail.com

Каротиноиды являются биологически активными веществами, которые получили широкое распространение в природе. Они содержатся в бактериях, грибах, водорослях и высших растениях и выполняют в фотосинтезе несколько основных функций (структурную, светособирающую и защитную). Последняя функция объединяет два различных процесса: тушение триплетных состояний молекул хлорофилла или бактериохлорофилла и нейтрализация синглетного кислорода.

Целью данной работы было исследование тушения и генерации синглетного кислорода C_{40} каротиноидами с различным количеством сопряженных двойных связей (СДС). В качестве объектов исследования были использованы восемь каротиноидов с 3-13 СДС (фитоин, фитофлуин, ликопин и др.), которые были получены из пурпурных бактерий, а также листьев и плодов томата. Образование и тушение синглетного кислорода регистрировали путем измерения его собственной инфракрасной фосфоресценции при 1270 нм. Квантовый выход генерации синглетного кислорода измеряли, используя в качестве эталона органические фотосенсибилизаторы: феналенон и метиленовый синий. Скорость фотопоглощения кислорода на постоянном свете также определяли амперометрическим методом при освещении красным светом интенсивностью 450 Вт/м² (фильтр КС-11, лампа КГМ 220-500) в течение 60 сек с применением электрода Кларка. В качестве ловушки синглетного кислорода использовали гистидин. Изученные каротиноиды существенно различались по своей способности фотосенсибилизировать и тушить синглетный кислород. Было установлено, что протекторная способность слабо выражена у фитоина, фитофлуина и дзета-каротина. При действии УФ-А излучения фитофлуин и дзета-каротин проявляли прооксидантную активность с квантовыми выходами генерации синглетного кислорода $0,39 \pm 0,06$ и $0,014 \pm 0,003$, соответственно. Следовательно, их можно рассматривать как потенциальные сенсибилизаторы фотодинамического стресса в клетках живых организмов. Установлено, что лучшие антиоксидантные свойства показали четыре каротиноида: родопин, ангидрородовибрин, спириллоксантин и ликопин, которые снижали скорость образования синглетного кислорода на 22-29%. Предполагается, что способность каротиноидов тушить или генерировать синглетный кислород обусловлена энергией их триплетных состояний.

Работа частично поддержана грантом РФФ № 22-74-10086.

ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА STATE TRANSITIONS У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Балашов Н.В.¹, Ветошкина Д.В.¹, Борисова-Мубаракшина М.М.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

kbalashov@mail.ru

Способность фотосинтезирующих организмов адаптироваться к различным изменениям условий окружающей среды, в частности к условиям освещения, является важнейшим фактором их выживания и устойчивости. При изменении спектрального состава света в растениях запускается процесс state transitions (процесс изменения состояний фотосинтетической антенны), который является одним из краткосрочных адаптационных ответов и протекает, преимущественно, при низкой интенсивности света. Ключевым ферментом, участвующим в запуске state transitions, является STN7 киназа, которая осуществляет фосфорилирование белков Lhcb1 и Lhcb2 внешнего антенного комплекса фотосистемы 2, что приводит к миграции этого комплекса от фотосистемы 2 к фотосистеме 1. В условиях повышенной освещенности происходит ингибирование киназы, однако механизм ингибирования STN7 киназы до сих пор не выяснен.

STN7 киназа – трансмембранный белок; окислительно-восстановительное состояние цистеиновых остатков, входящих в состав STN7 киназы, как было предположено, связано с активностью этого фермента. Известно, что цистеиновые остатки ряда ферментов, в том числе киназ, являются основной мишенью пероксида водорода в биологических объектах. Нами предположено, что ингибирование активности STN7 киназы может быть связано с образованием молекул пероксида водорода в тилакоидных мембранах, увеличение которого происходит в условиях повышенной освещенности.

В представленной работе изучено влияние пероксида водорода на светозависимое накопление фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 антенного комплекса фотосистемы 2. Объектом исследования являлись изолированные тилакоиды, выделенные из растений *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0. Было показано, что добавка к тилакоидам пероксида водорода в концентрации 250 и 500 мкМ при освещении (красный свет, 60 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) приводила к снижению светозависимого накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2. При этом пероксид водорода в выбранных концентрациях не влиял на скорость электронного транспорта по фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Кроме того, нами была также доказана специфичность действия пероксида водорода на STN7 киназу: при добавке пероксида водорода в выбранных концентрациях не происходило снижения накопления фосфорилированного белка D1, который является продуктом фосфорилирования другой киназы, STN8 киназы.

Полученные в ходе работы результаты доказывают, что пероксид водорода ингибирует протекание процесса state transitions за счет подавления активности STN7 киназы.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №22-74-10088.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *LEONTOPODIUM DISCOLOR* BEAUVERD: КАК И ЗАЧЕМ?

Бердасова К.С.

Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

k.berdasova@mail.ru

В данной работе представлены предварительные результаты введения в культуру *in vitro* *Leontopodium discolor* Beauverd. Данный вид является многолетним растением, прицветники которого не равны по длине, благодаря чему образуют несимметричную «звезду». Вид перспективен для использования в озеленении, в связи с чем был выбран в качестве объекта. Семена предоставлены М.Н. Колдаевой, собраны близ поселка Де-Кастри (Хабаровский край, Россия). Стерилизация семян в стадии полной зрелости была проведена 1% раствором нитрата серебра (15 минут) с предварительной отмывкой 0,1% раствором Твин-80 в течение 20 минут. Далее семена промывались 1% раствором хлорида натрия и затем трижды – стерильной дистиллированной водой. Стерилизованные семена равномерно распределялись по поверхности питательной среды Мурасиге и Скуга и культивировались в условиях темноты при 5 ± 2 °C на 20 суток. По истечении данного срока культуральные сосуды были перенесены в условия освещенности 3000 лк. (фотопериод 16/8 ч свет/темнота) и температуры 23 ± 3 °C. Первые проростки зарегистрированы через 2 суток культивирования на свету. Еще через 2 суток отмечалась массовая всхожесть семян, однако доля прорастания составила лишь 22%. Все проростки были жизнеспособными. После образования первых 3-х пар листьев микрорастения культивировались на той же питательной среде, но с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрациях 1 и 1,5 мг/л с целью наращивания растительного материала для дальнейших исследований. На данных средах были отмечены рост и образование дополнительных побегов. При культивировании микрорастений *L. discolor* на питательной среде с добавлением 1 мг/л 6-БАП отмечались процессы ризогенеза. А при увеличении концентрации 6-БАП до 1,5 мг/л корни не формировались. Использование 1 мг/л 6-БАП является оптимальным для наращивания биомассы *L. discolor* и дальнейших исследований по адаптации к условиям *ex vitro*. Продолжение данного исследования будет способствовать оптимизации условий при разработке протоколов для получения качественного растительного материала в целях озеленения и иметь ценность для решения проблем «зеленой» архитектуры.

Исследование проведено на базе уникальной научной установки «Коллекция живых растений *in vitro* Ботанического сада-института ДВО РАН» по теме государственного задания «Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии». Регистрационный номер: 122040800086-1.

ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА И УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕФИЦИТУ КИСЛОРОДА У
ОБРАЗЦОВ *ORYZA SATIVA* L. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО
НАУЧНОГО ЦЕНТРА РИСА

Богданова Е.М., Бертова А.Д., Бикташева М.О., Шапиро А.С.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,
Санкт-Петербург, Россия

bogdanova.ekaterina15@gmail.com

Растения риса используют две стратегии адаптации к условиям кислородной недостаточности: активное избегание кислородной недостаточности (LOES – low oxygen escape syndrome) и пассивная стратегия покоя (LOQS – low oxygen quiescence syndrome). Первая стратегия характеризуется быстрым ростом побегов, в то время как вторая стратегия включает в себя торможение роста и обмена веществ, наиболее интенсивные при полном отсутствии кислорода. Отличительная способность проростков риса заключается в способности прорасти в условиях недостатка кислорода. На этапе прорастания первым развивается coleoptиль – ювенильный орган, выполняющий у злаков защиту настоящего листа. Цель данной работы состояла в оценке скорости роста и жизнеспособности coleoptилей в условиях затопления сортов и сортообразцов риса из коллекции Федерального научного центра риса, г. Краснодар. Суммарно было протестировано 36 сортов. Самыми быстрорастущими были сорта Спринт и Кубань 3. Наиболее медленно растущими были три сорта филиппинской селекции, несущие аллель *SUB1A* – главный фактор регуляции LOQS у риса (NHZ11 Y6-Y2-SUB1, NHZ8 SAL 14 SUB1, NHZ9 DT12 SUB1), китайский сорт Xiannui и отечественные сорта Аметист, Жемчуг, Наташа, Рапан и Южная ночь. Помимо роста в работе анализировали жизнеспособность coleoptилей, которую оценивали с помощью теста по восстановлению солей тетразолия. В условиях гипоксии у всех протестированных форм жизнеспособность значительно снижалась. У наиболее быстрорастущих сортов (Спринт, Кубань 3) интенсивность окраски солей тетразолия была выше как в контроле, так и в опыте, по сравнению с медленно растущими формами (Аметист, Южная ночь, филиппинские *SUB1A*-сорта).

В целом скорость роста коррелировала с интенсивностью метаболизма и устойчивостью к затоплению. Прямой зависимости между результатами лабораторного тестирования интенсивности роста и устойчивости с ростом и развитием растений риса в полевых исследованиях выявить не удалось.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-14-00096.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПОЛУАЛЬДЕГИДА ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ В ЛИСТЬЯХ С₃- И С₄-РАСТЕНИЙ

Бородин А.С., Бабичева Н.А., Новосельцева Д.П.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

borodin-artem-sp@mail.ru

В растениях важную роль в координации углеводного и азотного метаболизмов при адаптации к стрессовым условиям играет шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), который активируется при засолении. Продукт данного метаболического пути – янтарный полуальдегид – выступает субстратом для дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ПЯКДГ, КФ 1.2.1.24) и, в некоторых случаях, НАДФ-зависимой глиоксилатредуктазы (КФ 1.1.1.79).

Целью научной работы являлось исследование изменения активности дегидрогеназы янтарного полуальдегида в листьях растений в условиях солевого стресса. Объектами исследования были выбраны С₃- и С₄-растения, пшеница и кукуруза, соответственно. Стресс индуцировался инкубацией растений в 150 мМ растворе хлорида натрия. Активность фермента измеряли спектрофотометрически при 340 нм.

Изучение динамики активности ПЯКДГ показало, что скорость его функционирования через час экспозиции растений в солевом растворе, увеличивается более, чем в 5,3 раза у кукурузы, и в 2,3 раза у пшеницы. Максимальное значение активности было достигнуто на 6 час. Дальнейшая экспозиция растений в стрессовых условиях приводила к снижению активности ПЯКДГ и, к 12 часу эксперимента, достигала исходных значений, оставаясь на таком уровне до 24 часа экспозиции.

Увеличение активности фермента может являться адаптивной реакцией клеточного метаболизма в ответ на ингибирование хлоридом натрия митохондриального дыхания. Изменение активности фермента может осуществляться посредством контроля уровня транскрипционной активности генов за счет действия специфических транскрипционных факторов. Высокая скорость функционирования исследуемого фермента обеспечивает поддержание необходимого уровня АТФ за счет дополнительного поступления дыхательного субстрата в цикл трикарбоновых кислот. Также, важна роль ГАМК-шунта при стрессовом воздействии на растения в координации азотного и углеводного обменов. В частности, ГАМК-шунт влияет на гомеостаз сукцината и γ -гидроксибутирата и контролирует накопление активных форм кислорода в условиях засоления.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ИЛИ НОКАУТА АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ МИТОХОНДРИЙ НА АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ Пониженной температуры

Бражникова А.В.^{1,2}, Балашов Н.В.¹, Найдов И.А.¹, Борисова-Мубаракшина М.М.¹

¹ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

²Биотехнологический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

brazhnikovanastasia@yandex.ru

В митохондриях высших растений, а также в некоторых грибах и протистах была обнаружена альтернативная оксидаза (АОХ) — нечувствительная к цианидам терминальная оксидаза, окисляющая убухинол и восстанавливающая молекулярный кислород до воды. АОХ защищает митохондрии от чрезмерной генерации активных форм кислорода в стрессовых условиях, предотвращая перевосстановление митохондриальной электрон-транспортной цепи. Кроме того, доказана функция АОХ в термогенезе при цветении ряда растений, но роль АОХ в защите растений от холодового стресса все еще не до конца изучена.

В настоящей работе, используя растения арабидопсиса дикого типа и мутантные растения с гиперэкспрессией или подавлением экспрессии АОХ (antisense растения), была оценена значимость альтернативной оксидазы митохондрий в условиях пониженной температуры. При кратковременном и длительном воздействии пониженной температуры было измерено как изменяются морфологические характеристики растений, скорости фотосинтеза и циклического транспорта электронов, а также нефотохимического тушения. Также было измерено содержание разных аскорбатпероксидаз и пероксида водорода в листьях растений.

Обнаружено, что в растениях дикого типа и в обоих видах мутантных растениях, т.е. в растениях с гиперэкспрессией или antisense растениях, происходит одинаковое снижение максимального квантового выхода фотосистемы 2, а также функциональной активности фотосистемы 2 и всей фотосинтетической электрон-транспортной цепи в условиях пониженной температуры. Обнаружены также одинаковые изменения в количестве стромальной, тилакоидной, пероксисомной и цитоплазматической аскорбатпероксидаз во всех исследуемых генотипах растений. Однако скорость транспорта электронов через фотосистему 2 и фотосистему 1 была выше в обоих видах мутантных растений по сравнению с растениями дикого типа как на переходных процессах (1 мин освещения), так и на стационаре (10 мин освещения). При освещении светом высокой интенсивности во время измерений наибольшую скорость электронного транспорта регистрировали в antisense растениях. Таким образом можно заключить, что как гиперэкспрессия, так и подавление экспрессии АОХ не оказывают существенного влияния на адаптационную способность растений в условиях пониженной температуры, но изменения в количестве митохондриальной АОХ положительно влияют на скорость электронного транспорта в хлоропластах.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССОВ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ХРАНЕНИИ

Валиева В.А.^{1,2}, Пусенкова Л.И.²

¹Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

²Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

valiyeva.valeriya.01@mail.ru

Потери клубней от болезней при хранении достигают 70% ежегодно и наносят значительный ущерб сельскому хозяйству. Известно, что бактерии-эндофиты способны проникать во внутренние ткани и изнутри принимать участие в регуляции физиологических процессов и механизмов защиты клеток от патогенов.

В данной работе проанализировано влияние *B. subtilis* (штамм 10-4) на защитные реакции клубней картофеля в период хранения, которые оценивали по степени накопления в них конечного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА), пролина, выполняющего роль антиоксиданта и осмолита, а также биомаркера физиологического состояния – аскорбиновой кислоты (витамин С). Опыты проводили на клубнях картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Башкирский), выращенных по общепринятой технологии в полевых условиях из предобработанных *B. subtilis* 10-4 (10^8 КОЕ) маточных клубней и заложенных на хранение при $3\pm 1^\circ\text{C}$. Содержание МДА и пролина оценивали классическими спектрофотометрическими методами, витамин С – по методу Тильманса.

Установлено, клубни, выращенные из обработанных *B. subtilis* 10-4 семян, характеризовались пониженным содержанием МДА и повышенным содержанием пролина по сравнению с необработанным контролем через 30 и 90 дней хранения. Эти результаты подтверждают и аргументируют защиту клеток от повреждающего действия активных форм кислорода и контроль процессов старения и согласуются с имеющимися в литературе данными о снижении под влиянием РГРВ окислительных повреждений растений. В нашем эксперименте содержание витамина С в клубнях превышало величину этого показателя в контроле в 1,2 – 1,4 раза, что свидетельствует не только о более питательной ценности, но и их потенциальной способности противостоять инфекции при хранении. Таким образом, можно предположить, что проявленный защитный эффект штамма *B. subtilis* 10-4 будет способствовать лучшей сохранности клубней картофеля в период длительного хранения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00262, <https://rscf.ru/project/23-26-0026>.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТОЦИАНОВЫХ ПИГМЕНТОВ В КАЛЛУСЕ *O. BASILICUM*

Гвоздикова А.М.¹, Поливанова О.Б.²

¹Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН,
Оренбург, Россия

²Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
Москва, Россия

anastasiaporv@mail.ru

В работе получали каллус из листовых и стеблевых эксплантов *O. basilicum* (сорт Ереванский сапфир (ЕС), Русский гигант зеленый (РГЗ), Русский гигант фиолетовый (РГФ)) при культивировании их в пробирках с использованием пищевой плёнки на питательной среде MS с различным гормональным составом – с ауксинами (2,4-Д, ИУК) и цитокининами (БАП): 1) 1 мг/л 2,4-Д; 2) 2 мг/л 2,4-Д; 3) 3 мг/л 2,4-Д; 4) 3 мг/л БАП+0,3 мг/л ИУК. Для определения антоциановых пигментов в каллусе *O. basilicum* каллус экстрагировали смесью 90 %-ного этанола с 1 М HCl в соотношении 85:15. По 3 мл экстракта растворяли в 5 мл буферов pH=1 и pH=4,5 и после 30 мин ожидания измеряли поглощение при 510 и 700 нм. Суммарное содержание антоцианов рассчитывали по цианидин-3-глюкозиду. Эксперимент проводили в 3-кратной повторности.

Каллус из растений сорта РГЗ, индуцированный на среде, содержащей MS+1 мг/л 2,4-Д, отличался по цвету и размеру от каллуса из растений сорта РГФ (MS+2 мг/л 2,4-Д). Наиболее интенсивный цвет наблюдался, как и ожидалось, в мозолистой ткани, полученной из эксплантов сорта РГФ. Исследуемая мозоль была светло-фиолетового цвета. Экспланты сорта РГЗ образовали калли светло-зеленого цвета, которые не были однородными, а с появлением секторов зелено-коричневого цвета. Когезия и структура поверхности калли различались в зависимости от используемых регуляторов роста в среде. Анализируя когезию клеток, было замечено, что мозоль в присутствии 2,4-Д была твердой, а структура поверхности была узловато-подобной. Присутствие ИУК и БАП в среде привело к ослаблению структуры поверхности мозоли. Ткань была рыхлой в этих условиях, с небольшой долей твердых секторов. Что касается мономерных антоциановых пигментов, то существенных различий по содержанию в растениях сортов РГФ и ЕС выявлено не было, причем в растениях обоих сортов количество антоцианов значительно больше, чем в каллусах. При сравнении каллусной культуры на средах с различным гормональным составом также не выявлено различий. Таким образом, разницы в содержании антоцианов для растений не выявлено, как и для каллуса на средах с различным гормональным составом.

ИЗУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПАРАМЕТРОВ И ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА
HEDYSARUM L. DAGHESTANICUM RUPR. EX BOISS

Гусейнов А.О., Магомедова А.А., Пиняскина Е.В.

ДГУ Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

arturgusejnov2001@gmail.com

В рамках проведения эколого-ботанического мониторинга перспективных сырьевых видов флоры Кавказа интерес вызывают представители рода *Hedysarum*, особенно эндемичные виды. К числу таких редких и эндемичных видов относится копеечник дагестанский (*Hedysarum L. daghestanicum*), занесенный в Красную книгу РФ (2008), мезоксерофит, растущий на высотах от 320 м до 1800 м. Измерение и анализ параметров флуоресценции хлорофилла *a* позволяет диагностировать физиологическое состояние растений, выяснить механизм действия стресса на исследуемый объект и оценить адаптационные возможности. Нами исследованы (ПАМ-флуорометрия) флуоресцентные параметры копеечника как при темновой адаптации, так и в естественных условиях на свету. Флуоресцентные исследования показали, что потери избыточной энергии в виде максимальной флуоресценции не велики и составляют 15%, в то время, основная часть поглощенного света ~60% идет на фотохимию, а оставшиеся 25% диссипируют в тепло. Максимальный квантовый выход фотосинтеза (Fv/Fm) высок и приближается к теоретически возможному 0,84, что указывает на высокую адаптацию копеечника к абиотическим факторам. Анализ дополнительных квантовых выходов ФС2 показал, что уровень регулируемых потерь (Y(NPQ)) составляет 20%, не регулируемых Y(NO) – 12%. Преобладание регулируемых потерь Y(NPQ) показывает, что потоки избыточной энергии хорошо регулируются (за счет работы ΔpH и зеаксантин-зависимых механизмов) и избыточная энергия возбуждения безопасно рассеивается на уровне антенны.

Поскольку одним из показателей адаптивности растения является соотношение Хл *a/b*, отражающее долю хлорофилла, связанного светособирающими комплексами и являющегося показателем функциональной пигментной оснащенности и свето-адаптации фотосинтетического аппарата, был проведен качественный и количественный анализ фотосинтезирующих пигментов копеечника дагестанского. Показано, что содержание Хл *a* превалирует, соотношение Хл *a/b* ≈ 3,22, а Хл (a+b)/Кар ≈ 5,5. что типично для светолюбивых растений. Увеличение количества хлорофилла и свето-собирающих комплексов, компонентов цикла Кальвина–Бенсона (особенно концентрации фермента РБФК) приводит к активации транспорта электронов, увеличению выделения кислорода и усилению ассимиляции углекислого газа, СО₂. Такие изменения имеют адаптивное значение, т.к. увеличение фотосинтетической способности снижает восприимчивость к фотоповреждениям.

Таким образом, проведенные исследования показали высокую адаптивность копеечника дагестанского к абиотическим стресс факторам, что свидетельствует о том, что данный мезофит, растущий в условиях сильной инсоляции и недостатка влаги, имеет комплекс специфических адаптаций, которые направлены на минимизацию амплитуды изменений физических параметров окружающей среды, предотвращающих разрушение фотосинтезирующих клеток и их органелл.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МХА *CERATODON PURPUREUS*

Джабраилова С.М., Шакиров Е.В., Валеева Л.Р.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

saidabio@icloud.com

Растущее число патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, устойчивых к известным антибиотикам, является одной из наиболее значимых глобальных угроз здравоохранению, из-за чего необходимость поиска новых антибактериальных соединений стоит особенно остро. В свою очередь, растения продуцируют большую часть всех известных вторичных метаболитов – уникальных соединений, отвечающих в том числе и за защиту от бактерий. В качестве резервуара биоактивных соединений большой интерес представляют бриофиты – неоднородная и многочисленная группа наземных растений, включающая печеночники, зеленые и антоцеротовые мхи. Бриофиты применялись в традиционной медицине на протяжении столетий, однако планомерное исследование соединений, обеспечивающих антибактериальную, противогрибковую, антиоксидантную и противоопухолевую активность этих растений, началось относительно недавно. При этом биоактивный потенциал внеклеточных метаболитов бриофитов все еще слабо изучен. Целью данной работы являлось определение антибактериальной активности секретируемых метаболитов мха *Ceratodon purpureus*.

Растения *Ceratodon purpureus* линии R40 (мужское растение) и GG1 (женское растение) культивировали в жидкой среде BCD в течение 2 или 4 недель. После двух недель культивирования отбирали образцы для анализа неочищенных метаболитов: культуральную жидкость фильтровали через нейлоновое полотно, замораживали и лиофильно высушивали при -52°C . После четырех недель культивирования культуральную жидкость фильтровали и проводили очистку секретируемых метаболитов с использованием ионообменной гидрофобной смолы Amberlite XAD-16. Метаболиты экстрагировали метанолом и высушивали на роторном испарителе при 30°C . Оценку антибактериальной активности проводили диско-диффузионным методом на бактериальных тест-культурах грамположительного (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) и грамотрицательного (*Serratia marcescens* SM6) морфотипов.

Показано, что неочищенные внеклеточные метаболиты *C. purpureus* линий R40 и GG1 обладали антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* (диаметр зоны ингибирования роста $9,6 \pm 1,5$ мм) при концентрации 32 мг сухого вещества. В свою очередь, полученные в результате очистки на амберлите низкомолекулярные внеклеточные метаболиты растений обеих линий подавляли рост грамположительных бактерий *S. aureus* ATCC25923 при концентрации 5 мг сухого вещества/диск (диаметр зоны подавления роста 10 ± 1 мм и 11 ± 1 мм соответственно). Антибактериального действия в отношении грамотрицательных бактерий *S. marcescens* SM6 обнаружено не было ни в одном из образцов.

Таким образом, из экссудатов линий бриофита *Ceratodon purpureus* R40 и GG1 были получены фракции низкомолекулярных соединений, обладающие антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям *S. aureus*. Дальнейший анализ биоактивных соединений из экссудатов исследуемого бриофита включает идентификацию и определение их физико-химических свойств.

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента СП-3391.2021.4 в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ФИТОГОРМОНОВ НА РОСТ КАЛЛУСОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ВЕРЕСКОВЫЕ И НА НАКОПЛЕНИЕ ИМИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Исмаилова А.А., Рыбин Д.А., Березина Е.В., Брилкина А.А.

ННГУ им. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

alinaismailova2000@bk.ru

Голубика щитковая (*Vaccinium corymbosum* L.), клюква болотная (*Oxycoccus palustris* Pers.) и клюква крупноплодная (*O. macrocarpus* Pers.) представители семейства Вересковые (*Ericaceae* Juss.) характеризуются повышенной способностью к синтезу и накоплению фенольных соединений (ФС), в первую очередь флавоноидов и проантоцианидинов. Для промышленного получения фенольных соединений используются каллусные культуры. Скорость деления клеток и их дедифференцировку при образовании каллусной массы, а также синтез в ней фенольных соединений можно регулировать с помощью экзогенных ауксинов и цитокининов. Целью работы являлось выявление оптимальных концентраций ауксинов и цитокининов в питательной среде для получения каллусов голубики щитковой, клюквы болотной и крупноплодной, а также оценка содержания в этих каллусах фенольных соединений.

Каллусы *V. corymbosum*, *O. palustris* и *O. macrocarpus* были индуцированы из листьев стерильных растений, размножаемых *in vitro*. Для инициации и выращивания каллусов использовали твердые питательные среды WPM (Woody Plant Medium) для голубики и Андерсона для клюквы с добавлением 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и БАП (бензиламинопурип) в соотношениях: 1) 0,1/0,1, 2) 0,5/0,5 и 3) 1/1 мг/л. Инициацию каллусов проводили в темноте в течение двух месяцев. После каллусы пересаживали на новую питательную среду с тем же составом и через месяц анализировали сырую и сухую массу, а также уровень фенольных соединений (сумма растворимых фенольных соединений ((СРФС), флавоноидов (Фл), катехинов (Кат) и проантоцианидинов (Про)).

Каллусы полученные из листьев голубики и двух видов клюквы не однозначно реагировали на разную концентрацию 2,4-Д и БАП в питательной среде. У голубики максимальный процент каллусообразования был отмечен на среде с добавлением 0,5/0,5 мг/л 2,4-Д/БАП – 88%, а минимальный на среде с 0,1/0,1 мг/л – 62%. При этом на среде с 0,1/0,1 мг/л каллусы были рыхлыми и светлыми, а на среде с 0,5/0,5 и 1/1 мг/л – более плотными и темными. Максимальная сырая масса каллуса получена на среде 1/1 мг/л – 0,18 г. Для каллусов голубики максимальный уровень ФС отмечен на среде с фитогормонами 0,5/0,5 мг/л и 1/1 мг/л: СРФС – 6,4 и 6,25; Фл – 3,3 и 2,1; Кат – 1,6 и 1,58; Про – 2,76 и 2,99 мг/г сырой массы. На среде с 0,1/0,1 мг/л ФС накапливались хуже в 2-3 раза. У клюквы обоих видов, иницируемых на среде Андерсона с такими же концентрациями фитогормонов, процент каллусообразования был ниже. Для *O. palustris* – максимальным он оказался на среде с 0,1/0,1 мг/л – 57,5%, а для *O. macrocarpus* – в случае 0,5/0,5 и 1/1 мг/л – 36%. На среде 0,1/0,1 мг/л

калусы *O. palustris* были плотными и темноватыми по центру, по краям желтоватые и слегка рыхлые, их масса составляла до 0,21 г. Для этих калусов обнаруживалось самое интенсивное накопление ФС: СРФС – 7,3, Фл – 4,3, Кат – 1,6, Про – 2,5 мг/г сырой массы. Для *O. macrocarpus* формировались светлые, рыхлые и оводненные калусы с наибольшей в исследовании сырой массой – до 0,37 г на среде с 0,5/0,5 мг/л. Однако калусы *O. macrocarpus* в наименьшей степени накапливали ФС – от 0,8 до 2 мг/г сырой массы.

Таким образом, культивирование калусных культур *V. corymbosum* и *O. macrocarpus* оптимальнее проводить при добавлении в среду ауксинов (2,4-Д) и цитокининов (БАП) в концентрации 0,5-1 мг/л, а для *O. palustris* наилучшим вариантом является сочетание 2,4-Д/БАП 0,1/0,1 мг/л.

Работа выполнена в ходе выполнения проекта РНФ, договор № 23-24-00403.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *DROSERA ANGLICA* HUDS.

Коваль О.Е.¹, Пьянова А.С.²

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

ksoks92.65@gmail.com

Для исследования влияния минерального состава на микроклональное размножение *Drosera anglica* Huds. были взяты питательные среды по прописям Мурасиге-Скуга (MS) и Кворина-Лепуавра (QL). Основываясь на ранее полученные нами результаты для росянки английской, где наилучшей средой была питательная среда Андерсона с половинным содержанием макроэлементов, в данном исследовании мы также сократили количество макроэлементов на ½ часть. Все эксперименты проводили при одинаковых физических условиях: освещенность 3 000 люкс, фотопериод 16/8 часов свет/темнота и 23 ±2°C.

При культивировании *D. anglica* на питательной среде по прописи QL было отмечено нормальное развитие листьев и микрорастений в первые 2-3 недели, отмечено образование дополнительных побегов. Однако, при дальнейшем культивировании на этой же среде рост микрорастений останавливался. Отклонений в развитии не отмечалось, все листья были крупными. В составе данной среды содержание азота низкое, поэтому растение развивает хорошие желёзки. Питательную среду с минеральным составом по прописи QL целесообразно использовать для поддержания вида в коллекции живых растений *in vitro*. Культивирование на среде MS приводит к медленному развитию листьев у микрорастений с небольшими размерами на первых этапах культивирования. При дальнейших субкультивированиях отмечается нормальный рост листьев, количество и размер увеличивается. Листья покрывают желёзки, но расположены редко, имеют слабую окраску, что может быть связано с обилием азота и, как следствие, отсутствием необходимости ловить насекомых. Отмечается образование дочерних микропобегов. На данной среде у растений хорошо развиваются корни. Усовершенствованный протокол микроклонального размножения *D. anglica* позволяет не только размножать, но и качественно сохранять живые растения в коллекции *in vitro*. К тому

же накопление растительной массы данного вида может служить источником для пополнения коллекций и дальнейшей реинтродукции на нарушенных территориях.

Исследование проведено на базе уникальной научной установки «Коллекция живых растений *in vitro* Ботанического сада-института ДВО РАН» по теме государственного задания «Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии». Регистрационный номер: 122040800086-1.

МОДУЛЯЦИЯ БАКТЕРИЯМИ-ЭНДОФИТАМИ *BACILLUS SUBTILIS* УСТОЙЧИВОСТИ У РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВОСПРИИМЧИВОСТИ К ОБЕЗВОЖИВАНИЮ РАСТЕНИЙ *TRITICUM AESTIVUM* L. В УСЛОВИЯХ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА И ЗАСУХИ

Ласточкин А.А.^{1,2}, Ибрагимов А.Э.¹, Ласточкина О.В.¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского
научного центра РАН, Уфа, Россия

² Уфимский институт науки и технологий, Уфа, Россия

oksana.lastochkina@ufaras.ru

Абиотические стресс-факторы, включая засуху и сочетание засухи с гербицидным прессингом приводят к значительному снижению роста и урожая/качества зерна пшеницы, что определяет актуальность решения данной проблемы. Микробные препараты на основе полезных штаммов бактерий-эндофитов рассматриваются как экологическая стратегия увеличения адаптивного потенциала и урожайности растений в стрессовых условиях среды.

В данной работе изучено влияние предпосевной инокуляции бактериями-эндофитами *Bacillus subtilis* (штаммы 10-4 и 26D) на всхожесть семян, рост и уровень окислительных повреждений у различающихся по степени восприимчивости к обезвоживанию гидропонных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях воздействия разных концентраций гербицида Sekator Turbo® (0, 25, 50, 75, 100 мл/л) и засухи (ПЭГ-6000; 0, 4, 8, 12%).

Выявлено, что на всхожесть, прорастание семян и рост проростков пшеницы существенно влияли различные концентрации и длительность воздействия гербицида Sekator Turbo® и ПЭГ-6000. Реакция семян пшеницы варьировалась в зависимости от сорта, а также концентрации и продолжительности стресс-факторов. С увеличением концентраций гербицида и ПЭГ-6000 наблюдалось постепенное снижение всхожести, прорастания и длины проростков; причем более выраженные рост-ингибирующие эффекты наблюдались на восприимчивом к обезвоживанию сорте. Инокуляция штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26D улучшала (в разной степени) всхожесть и прорастание семян, а также рост проростков обоих сортов в стрессовых условиях по сравнению с контрольными вариантами. Кроме того, в бактеризованных проростках пшеницы обоих сортов выявлено снижение уровня вызываемых гербицидом и засухой окислительных повреждений, о чем судили по содержанию в них малонового диальдегида. Это свидетельствует о защищенности бактеризованных растений от окислительных повреждений мембран клеток в условиях воздействия исследуемых стрессов. Важный вклад в проявление выявленного физиологического действия *B. subtilis* 10-4 и 26D на растения пшеницы обоих сортов может вносить их способность заселять внутренние ткани растения-хозяина и регулировать метаболизм изнутри. Полученные конструкции на основе

плазмид рНТ01, рНТ43 и генов зеленого (gfp) и красного (rfp) флуоресцентных белков, которыми были модифицированы штаммы *B. subtilis* 26D (26Dgfp) и 10-4 (104rfp), соответственно, позволят выявить характер становления симбиотических взаимоотношений между этими бактериями и растениями-хозяевами (пшеницей), проводить мониторинг циркуляции и локализации бактерий, как в норме, так и при воздействии стресс-факторов. Дальнейшие углубленные исследования расширят знания о механизмах становления эффективных взаимодействий между сортами растений и штаммами бактерий и могут быть использованы для полного раскрытия их потенциала и разработки эффективных микробиологических препаратов, повышающих адаптивный и продукционный потенциал пшеницы в условиях воздействия стрессовых факторов среды.

Работа поддержана грантом РФ №22-26-00076.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ФИТОГОРМОНОВ ЖАСМОНАТОВ В РЕГУЛЯЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

Лещенко Е.Ф.¹, Тихонов К.Г.², Савченко Т.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пушчинский государственный естественно-научный институт»,
Пушино, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

lena.lenojk@ya.ru

В последние годы погодно-климатические условия на Земле становятся менее благоприятными в связи с циклическими изменениями климата и загрязнением атмосферы. Под воздействием разнообразных негативных факторов окружающей среды у растений развиваются различные виды стресса, в их число входит и окислительный стресс. Фитогормоны жасмонаты, являющиеся по своей природе оксипиринами, вовлечены в формирование защитных ответов на действие стрессоров как биотической, так и абиотической природы. Несмотря на то, что интерес к изучению жасмонатов уже многие годы не ослабевает, проблема выявления роли жасмонатов в регуляции ответных реакций растений в условиях окислительного стресса остается актуальной.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния жасмонатов на предотвращение окислительного стресса в *Arabidopsis thaliana*. В качестве объектов исследования использовали две генетические линии арабидопсиса – *Columbia* и *aos*. Растения линии *aos* характеризовались отсутствием фермента аллелоксидсинтазы и, как следствие, отсутствием оксипиринов жасмонатной ветви. Для анализа были взяты растения обеих генетических линий арабидопсиса, которые росли при пониженной температуре (примерно 15°C) и при нормальной температуре (23°C). В условиях пониженной температуры у растений развивались симптомы светового стресса из-за дисбаланса между активностью световых реакций фотосинтеза, слабо зависящих от температуры, и темновых реакций фотосинтеза, заметно подавленных в условиях пониженных температур. Нами была проанализирована активность некоторых ключевых водорастворимых ферментов антиоксидантной системы

(каталазы, пероксидазы и аскорбатпероксидазы), а также определено содержание хлорофиллов (*a* и *b*) и малонового диальдегида (МДА).

Было обнаружено, что присутствие жасмонатов способствует уменьшению проявлений окислительного стресса при пониженной температуре. Не имеющие жасмонатов растения, растущие в условиях пониженной температуры, характеризовались меньшим содержанием хлорофиллов по сравнению с генетической линией с жасмонатами (на 65%), тогда как при нормальных условиях различия между генотипами были сравнительно меньше (на 9%).

Присутствие жасмонатов по-разному влияет на ферменты антиоксидантной системы: активности пероксидазы и аскорбатпероксидазы выше на 52% и 47%, соответственно, в растениях, содержащих жасмонаты, при нормальных условиях, в то время как активность каталазы ниже на 17%. При стрессе различия по активностям пероксидазы и аскорбатпероксидазы между генотипами уменьшались, а по активности каталазы увеличивались.

Большим перекисным окислением липидов биологических мембран, степень которого оценивается по количеству МДА, характеризовалась линия *aos*, отличающаяся отсутствием жасмонатов. В отличие от *aos*, у линии *Columbia* антиоксидантная система работает более эффективно и, как следствие, содержание МДА меньше (на 38%).

Работа поддержана грантом РФ №22-16-00047.

РЕАКЦИЯ *SECALE CEREALE* L. НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ЗАСОЛЕНИЯ NaCl В СОЧЕТАНИИ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ pH КОРНЕВОЙ СРЕДЫ

Мальцева А.Д., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

malseva15@gmail.com

В природных и техногенных ландшафтах засоление почв может сопровождаться как повышением уровня pH до щелочных значений, так и понижением – до сильноокислых. При этом растения испытывают комплексный солевой и щелочной стресс, солевой и кислотный стресс, а адаптивные механизмы направлены на осморегуляцию, защиту от избытка засоряющих ионов и окислительных радикалов, pH-регуляцию. Солевой стресс всегда сопряжен с накоплением активных форм кислорода, которые способны инициировать перекисное окисление. Малоновый диальдегид (МДА) является продуктом перекисного окисления липидов, увеличение его содержания свидетельствует о повреждении клеточных мембран в результате окислительного стресса. Глицинбетаин (ГБ) играет важную роль в растениях при различных типах стресса: в осморегуляции, взаимодействует с макромолекулами, сохраняя их активность, поддерживает целостность мембран в стрессовых условиях, обезвреживает АФК, поддерживает редокс-статус клетки.

Таким образом, целью нашего исследования было проследить реакцию растений ржи посевной на воздействие засоления NaCl на фоне разной кислотно-щелочной реакции корневой среды по содержанию МДА, который характеризует ответную реакцию растений на окислительный стресс, и содержанию ГБ в листьях, как проявление защитных механизмов растений при техногенном засолении.

Объектом исследований являлась *Secale cereale* L., сорт Фаленская. В качестве субстрата для выращивания использовали вермикулит. На 7 день после появления всходов растения подвергали воздействию стресс-факторов: в корневую среду добавляли растворы с различным уровнем pH (pH3, pH7, pH10) в сочетании с засолением NaCl 150 мМ и без него. Для создания щелочной среды использовался боратный буфер, для кислой – ацетатный. Контрольным являлся вариант с pH7 без засоления. Сбор материала проводили через 2, 4, 6, 24, 48, 72 ч после стресс-воздействия. Перекисное окисление липидов определяли по количеству соединений, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой в пересчете на МДА. ГБ определяли по методу Grieve and Grattan.

Наибольшее количество МДА было отмечено в условиях кислой реакции корневой среды, как с засолением (выше контроля на 28% и 17% через 48 и 72 ч соответственно), так и без (на 35% выше контроля через 72 ч). Достоверных отличий по содержанию МДА между контрольным и вариантом pH 10, как с засолением, так и без него, обнаружено не было на всем протяжении эксперимента. Статистически значимое увеличение МДА в варианте pH7 с NaCl-засолением относительно контроля было отмечено через 48 ч после воздействия стресс-фактора на 13%. В остальные временные промежутки достоверных различий не отмечено.

Наибольшее содержание ГБ отмечено в условиях кислой реакции корневой среды, как с засолением (на 40% выше контроля через 48 ч), так и без него (на 61% выше контроля через 24 ч). В условиях щелочной реакции среды, как с NaCl, так и без него пик концентрации ГБ был обнаружен через 24 ч (на 42% и 35% выше контроля соответственно), после чего количество его стало снижаться. Засоление на нейтральной среде вызывало повышение уровня ГБ относительно контроля через 2 и 6 часов на 20% и 15% соответственно, в остальные промежутки времени различий не обнаружено.

Таким образом, наиболее яркие проявления окислительного стресса, связанные с накоплением МДА, и адаптационных механизмов (по содержанию ГБ) отмечены на фоне кислой реакции среды, как с засолением, так и без него.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ ШУМАНОВСКОГО ДИАПАЗОНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ

**Мшенская Н.С.^{1,2}, Гринберг М.А.^{1,2}, Синицына Ю.В.^{1,2}, Кальясова Е.А.¹,
Воденев В.А.^{1,2}, Ильин Н.В.², Мареев Е.А.²**

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской Академии наук, Нижний Новгород, Россия

tasya.mshanka@yandex.ru

Считается, что физические факторы с низкой интенсивностью способны повышать устойчивость растений к неблагоприятным факторам, особенно к засухе. К таким факторам можно отнести и электромагнитные излучения низких и сверхнизких частот. Излучения в этом диапазоне частот постоянно присутствуют в магнитосфере Земли и носят название резонанса Шумана, их источником является грозовая активность в атмосфере.

Целью данной работы было выявление влияния магнитного поля (МП) с частотой 14,3 Гц (что соответствует второй гармонике резонанса Шумана) на транспирацию и фотосинтез растений пшеницы в условиях засухи.

Растения пшеницы мягкой яровой проращивали, разделив их на две группы: первая группа росла в условиях дополнительного к геомагнитному полю воздействия МП с частотой 14,3 Гц, вторая – без дополнительного влияния МП. В течение этого времени полив был регулярным. Переменное магнитное поле создавали с помощью соосно расположенных колец Гельмгольца. По истечении двух недель, каждую из групп разделили еще на 2 группы (контроль и засуха). Контрольные растения продолжили поливать в том же режиме, в группах с засухой полив был полностью прекращен.

По мере развития засухи в ходе всего эксперимента регистрировались фотосинтетические показатели, относительная транспирация, относительное содержание воды и площадь листьев. В конце эксперимента, на 12-й день засухи, измеряли длину побега, а также сырую и сухую массу побегов пшеницы.

Полученные результаты свидетельствуют о защитном действии магнитного поля на растения в условиях засухи; магнитное поле способствовало более длительному (около 2 дней) поддержанию процессов транспирации и фотосинтеза на уровне контроля. В то же время, при отсутствии стрессора (засухи) влияния электромагнитного поля на исследуемые параметры отмечено не было, за исключением снижения уровня относительной транспирации.

Таким образом, магнитное поле с частотой второй гармоники резонанса Шумана способно оказывать протекторное воздействие на физиологические параметры растений пшеницы в условиях засухи, замедляя развитие нарушений фотосинтетических процессов и транспирации.

Работа выполнена при финансировании Министерством науки и высшего образования (соглашение № 075-15-2019-1892).

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА В СТРОМЕ ХЛОРОПЛАСТА

Невзорова А.А.^{1,2}, Вильянен Д.В.¹, Козулева М.А.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева,
Самара, Россия

nastua_nevzorova06@mail.ru

Эффективность ассимиляции углекислого газа в ходе фотосинтеза зависит от концентрации CO₂ в строме хлоропласта, что определяется его содержанием в воздухе и эффективностью системы его поставки в хлоропласт. Вероятно, что дисбаланс в содержании углекислоты в строме запускает защитный механизм, приводящий к подстройке скорости фотосинтетического электронного транспорта, что может реализовываться на этапе окисления пластогидрохинона на люменальной стороне цитохромного b6/f комплекса.

Предположительно, что в передаче сигнала в люмен тилакоида о дисбалансе в содержании CO_2 в строме хлоропласта участвуют тилакоидные карбоангидразы (КА) – ферменты, катализирующие обратимую гидратацию углекислого газа.

В данной работе было исследовано влияние повышения концентрации CO_2 в воздухе (с атмосферного до 1200-1500 ppm) на показатели работы фотосинтетического аппарата растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) дикого типа, мутанта с нокаутированным геном *At1g08065*, кодирующим карбоангидразу альфа-5 ($\alpha\text{КА5}$), которая локализована в тилакоидных мембранах со стромальной стороны, и нокаутированным геном *At3g01500*, кодирующим растворимую карбоангидразу стромы бета-1 ($\beta\text{КА1}$). С помощью DUAL-PAM-100 оценивали изменение таких параметров, как квантовые выходы фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) (пропорциональны скорости электронного транспорта), нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла а, лимитирование на акцепторной стороне ФС I (отражает нарушения в оттоке электронов от ФС I к путям ассимиляции CO_2) и лимитирование на донорной стороне ФС I (отражает срабатывание фотосинтетического контроля – замедления окисления пластогидрохинона на люменальной стороне цитохромного b6f комплекса). Измерения прижизненных параметров в динамике производились с регулированием концентрации углекислого газа в закрытой камере.

Результаты исследований показывают немонотонное изменение исследуемых параметров в ответ на повышение концентрации CO_2 с четко выраженным переходным периодом. В частности, наблюдали резкие колебательные изменения показателей нефотохимического тушения и лимитирования на донорной стороне ФС I, что свидетельствует об аналогичных колебательных изменениях pH люмена. Показатель лимитирования на акцепторной стороне ФС I, напротив, резко возрастает и далее падает практически до начальных значений. Растения, у которых отсутствует $\alpha\text{КА5}$, подвержены более резким изменениям практически всех показателей, особенно параметра, характеризующего лимитирование на акцепторной стороне ФС I. Эти данные свидетельствуют о важной роли $\alpha\text{КА5}$ в регуляции содержания форм неорганического углерода в хлоропласте.

CRISPR/CAS9 НОКАУТ ГЕНА ФИТОИНДЕСАТУРАЗЫ *PDS* В ГЕНОМЕ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM* L. БЛОКИРУЕТ БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ

Нежданова А.В., Щенникова А.В.

Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

anna-negdanova@mail.ru

Редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9 направлено на получение нокаута или желаемой мутации в последовательности гена-мишени и используется как один из способов выявления его функции. У растений каротиноиды не только окрашивают цветки и плоды, привлекая насекомых и животных для опыления и распространения семян, но также участвуют в фотосинтезе, защите от фотоокислительного стресса и выработке фитогормонов и провитамина А.

Фитоиндесатураза (PDS) является одним из ключевых ферментов каротиногенеза, катализируя десатурацию предшественника всех каротиноидов – фитоина. Отсутствие активности PDS приводит к избыточному накоплению бесцветного фитоина, дефициту последующих каротиноидов (в том числе, ксантофиллов) и, как следствие, нарушению фотосинтеза и альбиносности листьев. Суперэкспрессия гена *PDS* способствует росту содержания α - и β -каротинов.

Семейство Паслёновые включает многие важнейшие сельскохозяйственные культуры, такие как картофель, томаты, баклажаны и перец. Помимо этого, в семейство входит известный модельный вид – табак *Nicotiana tabacum* L.

Целью исследования стала оценка эффективности применения метода CRISPR/Cas9 для редактирования Паслёновых агрокультур на примере получения и анализа растений табака. Ген *NtPDS* был использован в качестве мишени для редактирования, как визуально легко регистрируемый маркёр события редактирования.

Последовательность *NtPDS* анализировали с помощью программ CRISPRdirect и CRISPR MultiTargeter. В результате был определён консервативный участок экзона III (GAGATTGTTATTGCTGGTGCAGG), пригодный в качестве гидовой РНК, который использовали для создания конструкции на основе pYLCRISPR/Cas9P35S-N. С использованием конструкции, введенной в штамм агробактерии AGL0, была проведена агробактериальная трансформация листовых эксплантов растения табака с последующей селекцией регенерантов на среде, содержащей канамицин (100 мг/л). Устойчивость к антибиотику (укоренение побегов) и наличие альбиносных участков на поверхности листа свидетельствовали о событии трансгенеза и нокаута гена, соответственно.

Большинство регенерантов с признаками редактирования погибли (из-за почти 90-100% альбиносности). Выжило 14 трансгенных линий, которые характеризовались мозаичной зелено-белой окраской, а также карликовостью, замедленным развитием и сниженным количеством цветков. У данных линий было подтверждено наличие кассеты экспрессии гена *NPTII* в геноме (с помощью ПЦР). С использованием геномной ДНК, выделенной из листьев трансгенных/редактированных и нетрансгенных растений, был амплифицирован целевой участок гена *NtPDS*. ПЦР-фрагменты клонировали в вектор pGEM-Teasy и секвенировали (по 10 клонов в каждом случае). Структурный анализ целевых участков в 7 из 14 линий подтвердил факт редактирования выбранного участка гена. А именно, были зарегистрированы однонуклеотидные делеции или вставки, приводящие к сдвигу рамки считывания и, предположительно, синтезу неправильного белка, не способного выполнять функцию PDS.

Полученные результаты показали достаточную эффективность применения системы CRISPR/Cas9 для нокаута генов-мишеней у табака, а наличие большого процента нежизнеспособных регенерантов свидетельствует, что эффективность системы может быть ещё выше. Таким образом, данная система может быть успешно использована для редактирования генов ценных признаков и у других видов Паслёновых.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ПУЛЕ ПЛАСТОХИНОНА, ПРОИСХОДЯЩИХ В ФОТОИНГИБИРУЮЩИХ УСЛОВИЯХ

**Пыхова Е.С.^{1,2}, Вильянен Д.В.², Ашихмин А.А.²,
Борисова-Мубаракшина М.М.², Козулева М.А.²**

¹Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева,
Самара, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

katkapw@yandex.ru

В условиях избыточной освещенности фотосинтетический аппарат высших растений может подвергаться фотодеструкции, приводящей к потере активности – фотоингибированию. Было показано, что при действии света высокой интенсивности происходит потеря активностей пигмент-белковых комплексов фотосистемы 2 и фотосистемы 1 (ФС 2, ФС 1). Кроме того, в таких условиях могут происходить качественные изменения в пуле пластохинона, а именно в результате синглет-зависимого окисления пластохинона А (PQ-A) происходит накопление производных пластохинона, в частности, пластохинона С (PQ-C), т. е. гидроксипластохинона.

Целью данного исследования было выявить, образуется ли PQ-C при фотоингибирующем освещении изолированных тилакоидных мембран (ТМ). Объектом исследования служили интактные ТМ из листьев гороха посевного (*Pisum sativum*) и пластохинон, выделенный из листьев высших растений (шпинат, амарант и свекла). Пластохинон экстрагировали из листовой биомассы с помощью ацетон-гексановой смеси с последующей очисткой на оксиде алюминия и выделением фракции с помощью ВЭЖХ. Исследовали условия, при которых наблюдается фотоингибирование ФС 1, ФС 2 и полной фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ). Оценили развитие фотоингибирования в зависимости от времени освещения, сравнили действие красного и белого света, исследовали влияние добавки искусственных эффективных акцепторов электронов от ФС 1 – метилвиологена и феррицианида калия, а также исследовали эффект интенсивности света. Для этого ТМ освещали в заданных условиях, переосаждали и концентрировали, брали аликвоты для определения активности ФС 1, ФС 2 и ФЭТЦ. В отдельных модельных экспериментах с выделенным и очищенным пластохиноном следили за образованием PQ-C из PQ-A путем инкубации пластохинона (этанольный экстракт) в присутствии продуцента синглетного кислорода для определения времени выхода PQ-C при проведении ВЭЖХ, что необходимо для последующего анализа образования PQ-C в тилакоидных мембранах.

Показано, что с увеличением времени освещения ТМ наблюдается снижение активности как ФС 1, ФС 2, так и ФЭТЦ. Освещение красным и белым светом приводило к потере активности в схожей степени. Кроме того, добавка метилвиологена влияла на потерю активности в меньшей степени, чем добавка феррицианида калия. При этом, в фотоингибирующих условиях не удалось зарегистрировать накопление PQ-C в изолированных тилакоидах, что может свидетельствовать о том, что при таких условиях PQ-C не образуется. Таким образом, данные результаты показывают, что потеря активности фотосинтетического аппарата в изолированных тилакоидах не связана с накоплением PQ-C.

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН *IRIS MANDSHURICA* MAXIM.
ПРИ ВВЕДЕНИИ В *IN VITRO*

Пьянова А.С., Миронова Л.Н.

Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

berdasova_as@mail.ru

Семена *Iris mandshurica* Maxim. с длительным периодом покоя требуют стимуляции при проращивании, в том числе при культивировании *in vitro*. Выбор адекватных условий предварительной обработки и стерилизации семян имеет важное значение для улучшения всхожести исследуемого вида. Цель данного исследования – разработка протокола скарификации семян *I. mandshurica* из незрелых и зрелых коробочек и их эффективной стерилизации. Материалом служили зрелые и незрелые семена *I. mandshurica*. Предварительную обработку зрелых семян проводили концентрированной серной кислотой в течение 20 минут. Далее стерилизовали 1 % нитратом серебра (15 минут) с последующей обработкой 1 % раствором хлорида натрия. После стерилизации семена трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга без регуляторов роста (МС⁰). Закрытую незрелую коробочку окунали в 96% этиловый спирт и поджигали в пламени горелки. Далее извлекали семена (в стадии восковой зрелости) и помещали на питательную среду МС⁰ и МС + 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП). Для семян скарифицированных серной кислотой массовое прорастание отмечали на 13 сутки культивирования, а всхожесть при данном способе составляла 80%. При использовании незрелых семян прорастание регистрировали лишь на 35 сутки и всхожесть достигала 72% при культивировании на МС⁰. Стоит отметить, что при добавлении в питательную среду 6-БАП всхожесть незрелых семян повышалась до 89%. Во всех случаях отмечали 100% эффективность стерилизации семян. В данном исследовании была показана возможность значительного ускорения процесса скарификации зрелых семян с помощью серной кислоты, которая повышает всхожесть в короткие сроки. Высокая эффективность стерилизации в данном случае обусловлена агрессивным компонентом, поскольку концентрированная серная кислота не только нарушает семенную оболочку, но также разрушает споры грибов и бактерий. Добавление в питательную среду 0.5 мг/л 6-БАП при использовании семян в стадии восковой зрелости может быть использовано, как альтернативный путь введения в культуру *in vitro I. mandshurica*.

Исследование проведено на базе уникальной научной установки «Коллекция живых растений *in vitro* Ботанического сада-института ДВО РАН» по теме государственного задания «Введение в культуру, изучение и сохранение генетических ресурсов хозяйственно ценных растений Восточной Азии». Регистрационный номер: 122040800086-1.

ОЦЕНКА STATE TRANSITIONS У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Рыжих Ю.С., Терентьев В.В., Ветошкина Д.В.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

ryzhikh.yuliya@bk.ru

Фотосинтезирующие организмы постоянно сталкиваются с изменениями количества и качества освещённости. Одним из адаптационных механизмов при изменении спектрального состава падающего света является процесс перехода состояний (state transitions). State transitions представляет собой перераспределение светособирающих комплексов (ЛНСII) между двумя фотосистемами. Выделяют 2 состояния: при состоянии 1 ЛНСII связаны исключительно с ФСII, а при состоянии 2 подвижные комплексы ЛНСII мигрируют и связываются с ФСI. Белки ЛНСII фосфорилируются STT7-киназой, что способствует их перераспределению от ФСII к ФСI.

В данной работе исследовано влияние повышенной освещенности на state transitions у микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii*.

Клетки дикого типа *C. reinhardtii* (CC503) – штамм, лишенный клеточной стенки, выращивали в автотрофных условиях при температуре 25°C, 5% CO₂, при непрерывном освещении белым светом с интенсивностью света 100 мкмоль кванта м⁻²с⁻¹. Для эксперимента отбирали клетки в экспоненциальной фазе и в течение трех дней адаптировали их к повышенной освещенности (200 и 500 мкмоль кванта м⁻²с⁻¹). Протекание state transitions оценивали с помощью измерения низкотемпературной флуоресценции хлорофилла и определения соотношения ФСI/ФСII. Для перевода культуры в состояние 1 использовали DCMU (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) – данное соединение подавляет фотосинтез, блокируя транспорт электронов от ФСII к ФСI.

Для оценки протекания state transitions в ходе адаптации к повышенной освещенности сравнивали значения ФСI/ФСII, измеренные для клеток, адаптированных к темноте, с таковым значением освещенных красным светом до начала адаптации к повышенной освещенности и через 24 и 48 часов после повышения освещенности. Показано, что в первый день после повышения освещенности клетки водоросли оказываются не способны к осуществлению процесса state transitions, даже при его инициации в оптимальных условиях (красный свет, возбуждающий предпочтительно ФСII, низкой интенсивности света, время освещения 20 минут). Через 48 часов, после произошедшей адаптации к новым условиям освещения, клетки снова оказывались способны к осуществлению процесса state transitions, но в меньшей степени по сравнению с контрольными условиями.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ЭКСПРЕССИИ ЛАККАЗЫ ИЗ ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA* И
КСИЛОГЛЮКАНАЗЫ ИЗ ГРИБА *PENICILIUM CANESCENS*
В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ОСИНЫ

Селиванова Е.В.¹, Видягина Е.О.², Поддубная Н.Я.¹

¹Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушино, Россия

Ellesmera.alagesia@gmail.com

С помощью технологии генной трансформации возможно получать растения, экспрессирующие чужеродные ферменты, такие как лакказа и ксилоглюканаза. Было доказано, что эти гены способны значительно улучшить качество древесины, изменять различные фенотипические и биохимические свойства, а, следовательно, изменять возможности применения модифицированной древесины. Так как данные ферменты имеют множество полезных свойств, целесообразно создавать трансгенные растения, экспрессирующие её в больших количествах. Целью данного исследования являлось изучение и анализ различных эффектов экспрессии лакказы из гриба *Trametes hirsuta* и ксилоглюканазы из гриба *Penicilium canescens* в трансгенных растениях осины.

Объектами исследования стали контрольные и трансгенные растения линий осин с рекомбинантным геном лакказы *Lac* 47-1 – дикий тип и модифицированные типы: 47Lac4; 47Lac5; 47Lac11; 47Lac8; 47Lac23. В экспериментах по анализу влияния трансформации с геном ксилоглюканазы *sp-Xeg* изучались контрольные растения *Populus tremula* (Pt), и трансформированные растения PtXVXeg1b; PtXVXeg2c; PtIGus5a; PtXIVXeg1c; PtXVIXeg8a; PtXVXeg3b; PtXVXeg1c. Все растения были получены путём агробактериальной трансформации и выращены в условиях *in vitro*.

В ходе работ проведено выделение суммарной РНК и ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии рекомбинантного гена лакказы *Lac* рассчитывали относительно линии 47Lac5 с минимальной экспрессией и считали за 1. Самая высокая экспрессия наблюдалась у линии 47Lac4 – 33456,53. Высокие показатели также наблюдались у линий 47Lac23-342,51 и менее высокой экспрессией обладала линия – 47Lac8 – 15,45. Анализ линий с рекомбинантным геном *sp-Xeg* показал, что самую высокую экспрессию имела линия PtXVXeg1c – 1504,429. Значительно меньшей экспрессией обладали линии PtXVXeg1b – 192,005; PtXVXeg2c – 25,72323; PtXIVXeg1c – 16,39291, хотя относительно контроля уровень экспрессии этих линий достаточно высок. Линию PtXVXeg3b с минимальной экспрессией брали за 1.

Был проведён анализ фенотипа линий растений с рекомбинантным геном лакказы. Измерялись толщина, высота, объём ствола, процент поражения кроны, количество отмерших веток и мёртвых растений. Выяснено, что статистически значимое уменьшение толщины и объёма наблюдается только у линии 47Lac23. Анализ экспрессии целевых генов и анализ фенотипа позволил выделить перспективные линии растений осин для различных нужд хозяйственной деятельности: 47Lac5, 47Lac8, 47Lac23, PtXVXeg1c, PtXVXeg1b, PtXVXeg2c, PtXIVXeg1c.

СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ЛИСТЬЯХ МНОГОЛЕТНИХ ЛУКОВ В ФАЗУ СТРЕЛКОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

Середин Т.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный
центр овощеводства», Одинцово, Россия

timofey-seredin@rambler.ru

В условиях 2021-2022 лет исследований нами были изучены основные биохимические показатели листьев многолетних луков, полученные из генетической коллекции отдела овощных культур ВНИИГР им. Н.И. Вавилова и из коллекции ВНИИО (филиала ФГБНУ ФНЦО). Для исследований образцы многолетних луков были взяты в третьей декаде июля, когда уже были сформированы стрелки и у некоторых образцов завязывались семена, но листовая аппарат был в хорошем состоянии и пригодным для употребления в пищу. Такие исследования не проводились, потому что в середине лета не все многолетние луки могут использоваться в пищу, лист становится жестким или такие виды как *Allium aflatanense* F. или *Allium suworowii* L.– эфемеридные виды из луковых в это время уже формируют семена и листьев на растении не имеют.

Необходимо отметить, что в ранее проведенных нами исследованиях по биохимическому составу листьев многолетних луков была показана тенденция содержание сухого вещества в листьях лука батун сорт Русский зимний (11,1%) такие же результаты мы получили и у образцов ВНИИО 35, 254 и 257, а также у образцов ВИР 134. Полученными данными по содержанию основных биохимических показателей мы хотели объяснить, что в пищевой рацион человека можно вводить зеленые листья многолетних луков не только в начале вегетации (первая-третья декада мая), но и в середине лета (третья декада июля).

Также нами были определены фотосинтетические пигменты в листьях многолетних луков в условиях 2022 года. В настоящих исследованиях показано содержание фотосинтетических пигментов: хлорофилл А, хлорофилл В и каротиноиды в листьях многолетних луков. Изучение биохимического состава многолетних луков позволило выявить сортовые различия и сходство образцов по основным его компонентам. В 2022 году был проведен биохимический анализ коллекционных образцов многолетних луков генетической коллекции ВНИИГР им. Н.И. Вавилова: 117 ВИР, 134 ВИР, 148 ВИР, 317 ВИР, 370 ВИР и 438 ВИР. Отмечено, что содержание хлорофилла А в листьях коллекционного образца 438 ВИР было максимальное 0,66 мг/г. Для описательной характеристики полученных данных мы использовали ранговый метод и расположили коллекционные образцы ВИР по мере убывания: 438 ВИР > 370 ВИР > 134 ВИР > 117 ВИР > 317 ВИР > 148 ВИР.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЛИПИДОМА БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ
UNDARIA PINNATIFIDA (LAMINARIALES)

Чадова О.А., Веланский П.В.

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Россия

chadova_95_95@mail.ru

Факторы окружающей среды, такие как температура, уровень освещенности и доступность питательных веществ, влияют на липидный состав морских организмов. Изучение изменений липидного состава водорослей важно для понимания их адаптации к меняющимся условиям среды. В нашей работе мы исследовали сезонную динамику липидома однолетней бурой водоросли *Undaria pinnatifida*.

Для анализа использовались верхние и нижние участки талломов *U. pinnatifida*, собранных с ноября по июнь в б. Соболев (Уссурийский залив, Японское море). Анализ молекулярных видов полярных и нейтральных липидов проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Содержание наиболее ненасыщенных молекулярных видов моногалактозилдиацилглицерина (МГДГ), таких как 20:5/18:4 в верхней части листовой пластины и 18:4/18:4 в нижней части, было максимальным зимой и весной. Летом увеличивалось содержание 20:4/18:4 и 18:3/18:4 МГДГ во всех частях пластины. Зимой в нижней части пластины увеличивалось содержание 16:0/18:4 дигалактозилдиацилглицерина (ДГДГ), а в верхней – 18:3/18:3 и 18:3/18:4. Уровень 20:4/18:4 ДГДГ увеличивался летом и осенью во всех частях листовой пластины, а доля 20:5/18:4 снижалась летом. Осенью и летом во всех частях пластины увеличивалось содержание наиболее насыщенных молекулярных видов сульфохинозилдиацилглицерина (СХДГ) – 14:0/16:0 и 16:0/16:0. Уровень 18:2/16:0 СХДГ был максимальным в феврале. Зимой и весной увеличивалось содержание фосфатидилглицерина (ФГ) 16:0/18:2 и 18:3/16:0-ОН, а осенью и летом – 16:0/18:1. Уровень главного молекулярного вида ФГ 18:3/16:1 повышался в феврале. Осенью и летом увеличивалось содержание молекулярных видов фосфатидилэтаноламина (ФЭ) с насыщенными жирными кислотами (ЖК) и ЖК 20:4, тогда как уровень молекулярных видов ФЭ, содержащих ЖК 18:3 и 20:5 был максимальным в зимние месяцы. Аналогичная тенденция наблюдалась в составе фосфатидилхолина. Содержание фосфатидилгидроксиэтилглицерина 20:5/20:4 было максимальным зимой, а 20:4/20:4 – летом. В зимние месяцы во всех частях листовой пластины водорослей увеличивалось содержание наиболее ненасыщенных молекулярных видов триацилглицеридов.

Сравнительный анализ липидома *U. pinnatifida* в зависимости от сезона показал, что полученные результаты являются отражением как функциональной роли липидов в клетке, так и адаптивных способностей организма к факторам окружающей среды.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ДЫМОВЫХ ГАЗОВ ТЕПЛОВЫХ ЭЛЕКТРОСТАНЦИЙ ОТ ДИОКСИДА УГЛЕРОДА С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОВОДОРОДА И ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Чемезова А.А.^{1,2}

¹Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение города Иркутска средняя
общеобразовательная школа № 24, Иркутск, Россия

²Детский технопарк «Кванториум Байкал», Иркутск, Россия

chemezova_2006@mail.ru

При сжигании ископаемого топлива для выработки электроэнергии и тепла образуются дымовые газы, содержащие диоксид углерода (CO₂). Современная тенденция к нулевым выбросам ставит перед электроэнергетическими компаниями задачу минимизировать воздействие сжигания углеводородов на окружающую среду.

Цель работы – исследовать возможность применения цианобактерий в лабораторных условиях для очистки дымовых газов от CO₂ и других вредных веществ с возможностью получения водорода и вторичных продуктов, а также разработать концепцию системы очистки выбросов на основе проведенных исследований.

С целью определения рода цианобактерий произведено микроскопическое исследование. Используя определители подтвердили, что цианобактерии в эксперименте относятся к роду *Nostoc*. Культивирование проводили на среде BG11.

Культивирование цианобактерий и автоматизация регистрации необходимых показателей проводилась на собранной самостоятельно лабораторной установке. Установка состоит из круглодонной трехгорлой колбы на 500 мл, питательной среды, описанной выше, датчика водорода, плата макетная безопасная, контроллер на базе Arduino, датчик температуры, люксметр, датчик CO₂.

Для оценки влияния подачи дымовых газов от сжигания угля прямо в питательную среду цианобактерий была поставлена серия экспериментов, для большего растворения CO₂ в питательной среде дымовые газы пропускались через распылитель. Для сжигания использовали каменный уголь Черемховского месторождения.

Сжигание угля в кварцевой трубке проводилось в предварительно измельченном состоянии, далее при помощи спиртовки доводили температуры до температуры горения, прокачивая при этом воздух при помощи аквариумного компрессора 3л/мин.

Горение угля сопровождалась выделением в основном CO₂ (около 58 % от исходной массы по экспериментальным данным), так концентрация CO₂ возросла в колбе с 70 ppm до 140 ppm, при этом наблюдается рост выделения водорода, при максимальной концентрации CO₂ в 241 ppm концентрация водорода – 1137 ppm. Далее после остановки сжигания стабилизируется углекислый газ на уровне – 75 ppm, а водород падает до 60 ppm.

Основными ограничениями для устойчивого выделения водорода являются чувствительность ферментов к кислороду, конкуренция за электроны между различными путями с использованием восстановленных электронов. Кроме того, дополнительные сложности связаны с нестабильностью процесса выделения водорода. Для коммерческой целесообразности необходимо увеличить скорость выделения водорода и продолжительность этого процесса.

Для создания промышленных установок по производству водорода предлагается реализовать систему очистки дымовых газов от сжигания органического топлива на тепловых электростанциях, что позволит резко удешевить стоимость производства водорода цианобактериями.

Дальнейшие исследования позволят подобрать оптимальные варианты культивирования цианобактерий, а также подобрать род цианобактерий способный производить водород в максимальном количестве.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА ЭНДОФИТНЫХ *BACILLUS SUBTILIS* С РАЗНЫМИ СОРТАМИ ФАСОЛИ ПО АКТИВНОСТИ ФИТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ

Чистоедова А.В., Матюнина В.Д., Маркова О.В., Шпирная И.А., Гарипова С.Р.

Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

achistoyedova@mail.ru

Эндофитные бактерии, являясь естественным микробиомом растения, способствуют их росту и развитию, выполняют целый набор функций, таких как обеспечение питания и защиты организма-хозяина, устойчивости к стрессам. В отличие от фитопатогенов эндофитные бактерии способны обходить реакцию системной защиты растений. Но при этом они по-разному влияют на продуктивность разнообразных видов и даже разных сортов растений. Предполагается, что причиной данной специфичности может быть интерференция ростстимулирующей и фитоиммунной (защитной) программ растений в ответ на инокуляцию эндофитными бактериями. При внедрение неэффективных штаммов бактерий в тканях растений образуется избыточное количество активных форм кислорода (АФК), что ведет к развитию окислительного стресса, в то время как эффективные штаммы способны быстро его «потушить» или вовсе не допустить.

Для проверки данной гипотезы были выбраны объекты исследования – районированные сорта фасоли Уфимская и Золотистая, отличающиеся по адаптивным свойствам и эффективности взаимодействия с эндофитными штаммами *Bacillus subtilis* 26Д (основа коммерческого препарата Фитоспорин-М) и 10-4 (перспективный штамм, депонирован в ВКПМ В-12988). Согласно трехлетним данным полевых испытаний было выявлено, что сорт фасоли Золотистая был отзывчив на инокуляцию штаммами *B. subtilis* 26Д и 10-4: предпосевная обработка семян обоими штаммами способствовала увеличению урожая на 25%. При этом инокуляция сорта Уфимская штаммом 26Д оказала негативное влияние на семенную продуктивность. Предполагается, что характер взаимоотношений пар симбионтов может зависеть не только природы штамма (способности продуцировать различные физиологически активные соединения), но и от дозы вносимых бактерий. Поэтому в схему опыта были включены варианты бактериальных обработок в дозах 10^5 и 10^8 кл/мл.

Целью исследования являлся анализ интенсивности развития фитоиммунных реакций (по содержанию перекиси водорода в растениях, по активности ферментов каталазы и пероксидазы) растений фасоли сортов Уфимская и Золотистая на инокуляцию разными дозами штаммами *B. subtilis* 26Д и 10-4.

Результаты исследования будут представлены на конференции и обсуждены в докладе.

Работа выполнена при финансировании гранта РФФ 23-24-00602.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА СОДЕРЖАНИЕ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ У КОНТРАСТНЫХ ПО
ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ *TRITICUM AESTIVUM* L. В УСЛОВИЯХ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ГЕРБИЦИДА И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ

Якупова А.И.^{1,2}, Автушенко И.А.^{1,2}, Ласточкина О.В.¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского
научного центра РАН, Уфа, Россия

²Уфимский институт науки и технологий, Уфа, Россия

albinayakupovaa@yandex.ru

Мягкая яровая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является стратегически важной зерновой и хлебной культурой, которая имеет большое значение для обеспечения продовольственной безопасности в мире. Применение на посевах пшеницы гербицидов против сорной растительности в сочетании с засухой существенно снижают рост растений, урожай и качество зерна. Одним из основных процессов первичного метаболизма растений, который напрямую связан с продуктивностью растений является фотосинтез.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния праймирования семян эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* (штаммы 10-4 и 26Д) на изменение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а, b и каротиноидов) у двух сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.; засухоустойчивый сорт Экада70, засуховосприимчивый сорт Салават Юлаев) в норме, в условиях отдельного и комбинированного воздействия почвенной засухи и гербицидов, а также в пост-стрессовый период. Вегетационные опыты проводили в контролируемых условиях с использованием сосудов с почвой. Семена непосредственно перед посевом замачивали в суспензиях *B. subtilis* 10-4, *B. subtilis* 26Д (опыт) или воде (контроль). Стрессовые воздействия моделировали путем опрыскивания 16-сут растений (фаза 3-4 листа) гербицидом Секатор Турбо (Байер, Германия) с последующей приостановкой полива на 7 дней (до достижения дефицита воды, на 60% ниже нормы); далее возобновляли нормальный полив (репарация).

Установлено, что воздействие засухи и в особенности комбинации гербицид+засуха существенно снижало содержание хлорофиллов а, b и каротиноидов, а также площадь листовой пластинки растений обоих сортов, что свидетельствует о нарушении процесса фотосинтеза. Предобработка штаммами 10-4 и 26Д предотвращала вызываемое стрессами падение пигментов у обоих сортов и поддерживало повышенный их уровень через 7 дней воздействия засухи (в особенности для сорта Экада70), а в пост-стрессовый период привело к более быстрому восстановлению (в сравнении с небактеризованными) практически до контрольных значений нестрессированных растений. Следует отметить, что после 4 дней воздействия засухи у сорта Экада70 бактериальные штаммы приводили к снижению содержания хлорофиллов с последующим (на 7 дней засухи) повышением до уровней, превышающих контроль, что может быть связано с перестройкой работы фотосинтетического аппарата с нормы на стресс. В нормальных условиях произрастания штаммы 10-4 и 26Д повышали содержание хлорофиллов и площадь поверхности листьев растений обоих сортов. Следует отметить, что во всех вариантах бактеризованные растения характеризовались большей площадью листовой пластинки в сравнении с небактеризованными. Применение отдельно гербицида само по себе до возникновения засухи не оказывало существенного

влияния на содержание пигментов обоих сортов. Полученные данные демонстрируют эффективность применения *B. subtilis* 10-4 и 26Д для защиты фотосинтетического аппарата растений пшеницы обоих сортов от повреждающего действия засухи и комбинации гербицид+засуха. А также свидетельствуют в пользу того, что одним из механизмов защитного действия бактерий-эндофитов *B. subtilis* на растения пшеницы в стрессовых условиях, вызываемых комбинацией гербицид+засуха, является их способность позитивно регулировать работу фотосинтетического аппарата растений.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-26-00076.

ЭКОЛОГИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ЗАСОЛЕНИЯ ДЕГРАДИРОВАННЫХ ПОЧВ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Аникина Е.А., Федотова А.В., Батаева Ю.В., Григорян Л.Н.

Астраханский Государственный Университет им. В.Н. Татищева, Астрахань, Россия

anikina.ekaterina199@gmail.com

Засоленные почвы Астраханской области сформировались в результате сложного взаимодействия факторов почвообразования. В различных засоленных почвах может присутствовать одно и то же количество солей, но в зависимости от их состава почвы могут быть токсичны для растений и других организмов. Цель данной работы состоит в изучении степени и типа засоления почв некоторых районов Астраханской области и исследовании микробных сообществ. Для изучения было отобрано 10 образцов из различных почвенных биотопов Астраханской области с различной степенью деградации. Проведены исследования по степени засоления, фитотоксичности и азотфиксирующей активности данных почв. В исследуемых пробах засоление представлено сульфатно-хлоридным, хлоридным, хлоридно-сульфатным типом. По степени засоленности почва сильнозасоленная, однако в пробе № 3 почва отмечена как средnezасоленная. На основании проведенных исследований выявлено, что по химизму преобладают почвы сульфатно-хлоридного и хлоридного типа засоления. По катионному составу, катионы Mg^{2+} преобладают над Ca^{2+} . Возможная причина избытка магния в почве — это грунтовые воды. На поверхности почвы выявлено скопление солевой корки, что указывает на длительное испарение почвенной влаги при постоянном подтягивании засоленных растворов к поверхности. Фитотоксичность почвенных образцов изучена методом ингибирования роста корня редиса. Наличие ингибирующего эффекта выявляется, сравнивая всхожесть семян и длину корня в контрольных и опытных вариантах. Всхожесть в данном случае не выявлена, что свидетельствует о токсическом действии исследуемых почв. Для выделения чистой культуры азотобактера был произведен посев почвы на агаризованную среду Эшби. Рост колоний в 8 образцах составил 100%, микроорганизмы рода *Azotobacter* хорошо развились в почве, что говорит о некоторых запасах органических веществ. Результаты, полученные при изучении деградированных почв Астраханского региона, вызывают большой интерес для проведения комплексных научных опытов, расширения сведений об объеме и разнообразии микроорганизмов экстремальных мест обитания.

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ОТХОДОВ ЧЕРНОЙ МЕТАЛЛУРГИИ НА ПШЕНИЦУ ЯРОВУЮ

Белова В.В., Баранчиков П.А., Чеботарева С.П., Захарова О.В., Гусев А.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»,
Тамбов, Россия

vuz.lera@gmail.com

В связи с возрастающим уровнем загрязнения окружающей среды разработка экологически безопасных способов утилизации отходов металлургии является одной из важнейших задач современности.

Целью предлагаемого исследования являлась оценка применимости доменного шлама в качестве источника микроэлементов в растениеводстве и конвертерного шлама, в качестве мелиоранта. Доменный шлак содержит в своем составе большое количество железа (до 50%) и таких важных микроэлементов как цинк, марганец, медь и др. Конвертерный шлак – кальцийсодержащий отход, который может стать заменой извести при раскислении почв.

В работе изучалось влияние шлама и смеси шлама со шлаком на морфометрические параметры пшеницы яровой (сорт Злата) в условиях лабораторного опыта на субстратах, моделирующих нейтральный (рН водной вытяжки около 6,5) и закисленный (рН водной вытяжки около 4,5) грунты. Субстратом служил очищенный прокаленный песок. Шлам вносили в концентрациях 0,01; 0,1 и 1 г/кг (с учетом норм ПДК цинка в почве); шлак – 0,8 г/кг в закисленный грунт и 0,6 г/кг в нейтральный. По окончании эксперимента проводили анализ накопления ТМ в проростках.

Результаты показали, что культивирование пшеницы в нейтральном субстрате с добавлением шлама повышало всхожесть на 20% при 0,1 г/кг и на 10% при 1 г/кг. При совместном внесении отходов всхожесть повышалась только на 10 – 11%. При совместном использовании отходов наблюдалось уменьшение длины корня на 10% при 1 г/кг шлама. Сухая масса корня так же уменьшалась при добавлении шлама, независимо от концентраций шлама, тогда как в среде, содержащей только 1 г/кг шлама, отмечен прирост сырой массы корня на 127%. В закисленном субстрате достоверного влияния на всхожесть пшеницы не обнаружено. При этом отмечено уменьшение длины стебля на 19% и длины корня на 17% при 1 г/кг шлама в среде, однако раскисление субстрата шлаком увеличило показатели длины корня в среднем на 12%. При 0,01 г/кг шлама в кислой среде, независимо от добавления шлама, длина корня увеличилась на 6 – 7%. На прирост массы стебля шлак оказал негативное влияние, как и на сырую массу корня. В то же время отмечено увеличение сухой массы корня – на 113% при содержании шлама 1 г/кг со шлаком в кислой среде. Анализ содержания опасных компонентов отходов в растительной биомассе не выявил их бионакопления.

Таким образом, использование доменного шлама в условиях рН-нейтрального грунта и смеси шлама и конвертерного шлама в закисленном, может стать хорошим агрохимическим приемом в растениеводстве.

ВЛИЯНИЕ КЛИМАТА НА ВОЗРАСТНУЮ СТРУКТУРУ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ЭКОТОНА ГРАНИЦЫ ЛЕСА НА П-ОВЕ ЯМАЛ

Бессонова В.А.¹, Кукарских В.В.¹, Дэви Н.М.¹

¹Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

bessonova-varechka@mail.ru

Тенденции к увеличению среднегодовой температуры особенно заметны в высоких широтах и арктических регионах, таких как п-ов Ямал, для которых характерно явление арктического усиления. В связи с этим приобретают актуальность исследования динамики растительности и депонирования углекислого газа в древесных растениях Арктического региона. Такие колебания климатических переменных напрямую влияют на динамику границы распространения древесной растительности и продуктивность древесных растений. На основании исследования ширины колец можно адекватно оценивать динамику структуры древостоев и накопления биомассы в ответ на повышение летних и сезонных температур, а также на изменение количества осадков.

В работе решались следующие задачи:

1. Проанализировать динамику продуктивности лиственничных древостоев на северной границе леса на Ямале.
2. Определить климатические факторы, влияющие на накопление фитомассы.

В работе использовались стандартные методы закладки пробных площадей при оценке динамики границы леса, а также общепринятые методы обработки дендрохронологического материала.

Живые деревья собирались на берегах реки Хадыга-Яха. Было заложено 12 пробных площадей общей площадью 10 875 м². Всего собрано более 500 деревьев. Для всех деревьев были определены морфометрические параметры (высота дерева, окружность/диаметр на высоте груди), а также отбиралось по 1-2 керна древесины на высоте 0,1 м от корневой шейки. Расчёт фитомассы деревьев проведен по формуле, полученной ранее для района Полярного Урала.

В результате было произведено сравнение пробных площадок в градиенте северного экотона границы леса на п-ове Ямал. На основании наблюдений по метеостанции Салехард для района исследования за последние 135 лет выявлено значительное повышение температуры (на 1,7 °С) и режима увлажнения.

В зоне верхней границы сомкнутых лесов плотность древостоев вышла на плато, после 1950-х гг., а в зоне редколесий – увеличивается до сих пор. Максимальное облесение (в 1,5–7 раз) произошло в период 1951–1980 гг. Начиная с 1920-х выявлено резкое увеличение скорости (в 9,8 раз) накопления фитомассы, особенно в зоне сомкнутых лесов. Увеличение плотности древостоя и радиального прироста совпало с увеличением среднелетних температур, что привело к увеличению фитомассы в среднем в 17 раз с 1921 года.

Сравнение динамики накопления фитомассы и структуры древостоев лиственницы и ели показало схожие результаты для обоих видов.

Работа поддержана грантом РФФ №21-14-00330

К ВОПРОСУ О СОХРАНЕНИИ ПОПУЛЯЦИЙ *RHODODENRON ADAMSII* REHDER. В ОКИНСКОМ РАЙОНЕ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ

Гальчеева М.А.

Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия

mezhidma03@gmail.com

Rhododendron Adamsii Rehder – небольшой вечнозеленый кустарник, более известный как «сагаан-дали», пользуется огромным спросом на рынке лекарственных растений, благодаря своему богатому химическому составу и сильным адаптогенным свойствам. Вид находится под охраной и занесен в Красную книгу Бурятии (2013). В связи с высоким хищническим собирательством сагаан-дали в Окинском и Тункинском районах Республики Бурятии, встал вопрос об исследовании жизненного состояния и урожайности популяций *Rhododendron Adamsii*.

Необходимо отметить, что *Rhododendron Adamsii* является психрофитом, произрастает на каменистых северных склонах подгольцового и нижнего гольцового пояса на высотах от 1458 м до 2007 м. (по нашим данным), образуя особые кустарниковые сообщества – адасорододендроновые тундры. В результате полевых исследований 2022 года нами были описаны 21 сообщество с участием *Rhododendron Adamsii* в нижнем течении реки Орлик (правый приток р. Ока), где Рододендрон Адамса преобладает (покрытие 0,2-0,6) в кустарничково-травяном ярусе вместе с *Carex stenocarpa* L., *Arctous erythrocarpa* Small., *Dryas punctata* Suz.

Для ресурсной характеристики вида нами было заложено 74 пробные площадки. На каждой из них проведены расчетно-измерительные работы: высота побега, длина и ширина листовая пластинка, количество генеративных побегов. Продуктивность площадок составляла от 33 до 124 гр. сырого сырья. Кроме этого был собран материал, показывающий восстановление особей после сбора местным населением. Нами отмечено активное побегообразование в местах срезов.

Таким образом, популяции *Rhododendron Adamsii* в Окинском районе Республики Бурятия требуют дальнейшего мониторинга.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭПИКУТИКУЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ САРАНЧОВЫХ ИЗ РАЗНЫХ АРЕАЛОВ ОБИТАНИЯ

Ганина М.Д.

Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия

tosya2021@yandex.ru

Азиатская саранча (*Locusta migratoria*) и итальянский прус (*Calliptamus italicus*) являются опасными сельскохозяйственными вредителями. Данные виды обладают разными гигротермическими преференциями: азиатская саранча – мезо-ксерофил, обитает во влажных

стациях вблизи водоемов, итальянский прус – ксерофил, предпочитает более аридный климат. Применение энтомопатогенных грибов является одним из эффективных методов борьбы с насекомыми-вредителями, в котором патогены проникают через защитный эпикутикулярный слой. Компоненты эпикутикулярного слоя задействованы в защите от обезвоживания и коммуникации. Известно, что итальянский прус более восприимчив к действию грибов *Metarhizium robertsii*. Целью данной работы являлись идентификация, количественное определение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов личинок азиатской саранчи и итальянского пруса методом хромато-масс-спектрометрии.

Идентификацию углеводов проводили на основе анализа рассчитанных и литературных индексов удерживания, характеристических ионов в масс-спектрах, а также с учетом биохимических путей синтеза метилразветвленных углеводов насекомых. Основными соединениями эпикутикулы саранчовых являлись нормальные, моно-, ди- и триметилразветвленные алканы состава C25–C39 и карбоновые кислоты, содержание которых не превышало 3% от эпикутикулы. Суммарное содержание компонентов было практически одинаково, но углеводородные профили отличались существенно. Так, у итальянского пруса было значительно выше содержание длинноцепочечных C35–C39 и диметилразветвленных алканов, а уровень монометилразветвленных и алканов в средней области C30–C34 гораздо ниже по сравнению с азиатской саранчой. Помимо этого у итальянского пруса обнаружены триметилалканы, отсутствующие в азиатской саранче.

Подобные различия в углеводородных профилях эпикутикулы, по-видимому, связаны с адаптацией к разным ареалам обитания двух видов саранчовых. Длинноцепочечные углеводороды итальянского пруса защищают от обезвоживания, а метилразветвленные алканы поддерживают постоянство липидной матрицы при больших колебаниях суточных температур в аридном климате. В то же время такая липидная композиция делает эпикутикулу итальянского пруса более восприимчивой к действию грибных патогенов.

Работа поддержана грантом РФ №20-74-10043.

СОХРАННОСТЬ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВАХ ЗАБРОШЕННЫХ СЕЛЬСКИХ ДОМОВЛАДЕНИЙ НА ВОДРАЗДЕЛЕ И В ПОЙМЕ ДОНА

Глебов К.Д.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

Kirillglebov556@gmail.ru, nkaashirskaya81@gmail.com

Известно, что в почвах, которые использовались в сельском хозяйстве и удобрялись, в больших количествах присутствуют термофильные микроорганизмы. Эти микроорганизмы широко распространены в окультуренных почвах земного шара. Органические удобрения – навоз и компост – являются основными источниками термофилов, поскольку способны разогреваться до высоких температур.

Целью работы было оценить численность термофильных микроорганизмов в почвах заброшенных сельских домовладений и выяснить, сохраняется ли эта группа

микроорганизмов в сельскохозяйственных почвах речных долин. В задачи входило отобрать образцы почвы из верхнего слоя на участках вблизи домов, во дворах и на картофельных огородах, посеять термофильные микроорганизмы на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду и сравнить их численность в окультуренных почвах водораздела и поймы.

Первая усадьба, расположенная на водоразделе, была заброшена 20 лет назад. Здесь хорошо сохранились хозяйственные постройки. Вторая усадьба располагалась в пойме Дона и была заброшена 50 лет назад. На месте полностью разрушенных построек остались микроповышения рельефа, окруженные характерной растительностью, с преобладанием чертополоха. В культурном слое были обнаружены фрагменты кирпича, угля, дерева, осколки керамических и стеклянных изделий.

Полученные результаты показали максимальную численность термофильных микроорганизмов на участках вблизи домов: на водоразделе – до 530 тыс. КОЕ / г почвы под плодовыми кустарниками, а в пойме – до 370 тыс. КОЕ / г почвы под чертополохом. Во дворах на водоразделе численность термофилов снижалась в 2 – 5 раз, а в пойме – в 5 – 14 раз. На территории картофельных огородов численность термофилов резко снижалась. Здесь на участках в 30 – 42 м. от жилых домов их численность на водоразделе была в 5 раз выше, чем в пойме. На участках, наиболее удаленных от дома, термофильный след исчезал. При этом за пределами усадьбы он снова обнаруживался. На водоразделе это было вполне ожидаемо, поскольку здесь за пределами усадьбы располагались удобряемые колхозные поля. На пойменном лугу за пределами усадьбы повышение численности термофильных микроорганизмов могло быть связано с выпасом скота. Кроме того, не исключен вынос термофилов на луг вместе с почвенным материалом, поскольку в пойме огород располагался на водосборной территории.

Таким образом, в результате проделанной работы нами были установлены сходные закономерности распределения численности термофильных микроорганизмов в почвах заброшенных сельских домовладений на различных элементах рельефа.

ВЫДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ ИЗ ГРУНТА СО ДНА ПОГРЕБАЛЬНЫХ СОСУДОВ АЛАНСКОЙ КУЛЬТУРЫ

Грачева Е.И.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

gelizaveta172@gmail.com, nkaashirskaya81@gmail.com

Погребальные сосуды часто встречаются в древних захоронениях. Как правило, они содержат грунт заполнения могильной ямы. Если в сосуд изначально помещалась пища, она полностью разлагалась в течение длительного времени за счет собственной микрофлоры и почвенных групп микроорганизмов, способных усваивать легкодоступное органическое вещество. При посевах микроорганизмов из грунта погребальных сосудов на твердые питательные среды, среди микробных колоний, ответственных за порчу пищи, в редких случаях можно заметить единичные колонии молочнокислых бактерий. Целью нашей работы

было выделить молочнокислые бактерии из древних ритуальных сосудов, где в придонном грунте сохранилось микробное сообщество, свидетельствующее об исходном присутствии пищи. В задачи входило: вырастить накопительные культуры молочнокислых микроорганизмов в селективном питательном бульоне MRS, получить колонии смешанных культур на твердой питательной среде, определить форму и размеры клеток молочнокислых бактерий и дрожжей, оценить их способность к сбраживанию молока и простых сахаров.

Объектами исследования были сосуды аланской культуры раннего Средневековья (III–IV вв. н.э.) из погребений курганного могильника «Братские курганы» (Надтеречный район Чеченской Республики).

Колонии смешанных культур лактобацилл (двуспоровые палочки 2–3 мкм), и дрожжей (клетки с диаметром 3–5 мкм) были получены на селективной твердой среде MRS, после накопительного инкубирования в аналогичном бульоне, в атмосфере CO₂. Выращивание колоний в кислородной атмосфере выявило различную способность к росту смешанных культур в аэробных условиях. В стерильном молоке культуры образовывали молочный сгусток при 40 °С в течение 3–12 часов. Была исследована способность выделенных смешанных культур к сбраживанию простых сахаров. Оптическую плотность клеток в растворах сахаров определяли на спектрофотометре. Раффинозу, мальтозу, сахарозу и лактозу микроорганизмы усваивали лучше, чем фруктозу, арабинозу и галактозу.

При сходной интенсивности сбраживания молока, культуры из сосудов, принадлежавших взрослым, показывали большую способность к образованию спирта, по сравнению с культурами из детского погребального инвентаря.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант 22-28-01725

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БАКТЕРИЙ С ПОЧВЕННЫМИ СЛИЗЕВИКАМИ КЛАССА DICTYOSTELIOMYCETES

Гришковец Д.С.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет
почвоведения, Москва, Россия

dianagrishkovets@gmail.com

Представители класса Dictyosteliomycetes – группа спорообразующих амебодных простейших, широко распространенная в почвах. Основной пищей для этих организмов являются бактерии, с которыми они могут образовывать сложные ассоциации.

Для определения таксономической принадлежности бактерий, ассоциированных со слизевиками класса Dictyosteliomycetes были изучены фенотипические и молекулярно-биологические (секвенирование переменного участка гена 16S рНК) признаки. Большинство изученных штаммов были отнесены к виду *Variovorax paradoxus* (класс β-Proteobacteria филума Proteobacteria).

Для постановки модельного опыта была выбрана среда SW/5 на основе сахарозы, рекомендуемая для поддержания жизнеспособности бактериальной затравки и культур диктиостелид. В качестве модельного объекта использовали *Dictyostelium discoideum* (strain DBS0237637 from Dicty Stock Center (Northwestern University, Chicago, IL, USA)), который помещали на бактериальный газон. Характер взаимодействий слизевика с бактериями регистрировали на 5, 10, 14 сутки под бинокулярной лупой.

В ходе опыта было замечено, что *D. discoideum* по-разному ведет себя при росте на разных видах бактерий в соответствии с 3 стадиями жизненного цикла: образование прозрачного ареала (активное потребление) – стадия агрегации (+); слизеобразование и образование прозрачного ареала – стадия спороношения (+-); бактерии не используются – переход диктиостелид от трофической стадии к спороношению (-).

Таким образом, проведенные исследования позволяют предположить, что в природных условиях почвенные слизевики класса Dictyosteliomycetes ассоциированы с бактериями *Variovorax paradoxus*, кроме того, при контакте с бактериями следующих таксонов: *Arthrobacter*, *Mycococcus*, *Variovorax* и *Escherichia*, наблюдается 1 тип взаимодействия (+), при контакте с представителями родов *Bacillus* и *Cytophaga* наблюдался 2 тип взаимодействия (+-), а при контакте с бактериями таких родов, как *Rhodococcus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Serratia* и *Chromobacterium*, наблюдался 3 тип взаимодействия (-).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СЛЕДЫ ДРЕВНЕГО СКОТОВОДСТВА В КУЛЬТУРНЫХ СЛОЯХ ПОСЕЛЕНИЯ ЭПОХИ ПОЗДНЕЙ БРОНЗЫ БАГАЙ-1 В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ КРЫМУ

Дедова К.С.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

nkashirskaya81@gmail.com

Для реконструкции инфраструктуры древних поселений используется оценка численности термофильных микроорганизмов, которые поступают в почву вместе с навозом. Другой диагностический признак культурного слоя скотоводческих поселений – численность кератинофильных грибов, указывающих на присутствие кератинсодержащих субстратов, таких как шерсть или перья. Целью данной работы была реконструкция инфраструктуры поселения эпохи поздней бронзы по численности этих диагностических групп микроорганизмов. Объектом исследования было поселение Багай-1, расположенное в Сакском районе республики Крым, в окрестностях с. Суворовское. Памятник был выявлен в 2012 г. Т.Н. Смекаловой, по пятнам более темной и густой растительности, с помощью космических снимков. Раскопки проводились в 2021 – 2022 гг. экспедицией ИА РАН, в процессе охранно-спасательных археологических исследований в Северо-Западном Крыму. Термофильные бактерии выращивались при 60°C в чашках Петри на глюкозо-пептонно-дрожжевой среде в течение 3 суток; кератинофильные грибы – при комнатной температуре на дисках из шерстяной ткани, в течение 7 суток.

В пределах исследованной площади поселения были обнаружены три крупные зоны – центральная, юго-западная и южная, отличающиеся по мощности культурного слоя и присутствию артефактов. В центральной зоне были изучены три объекта, идентифицированные как малый и большой загоны для скота, а также почва за пределами загонов. Эти объекты отличались особенно высокой численностью термофильных бактерий, которая в культурном слое достигала 850 – 950 тыс. КОЕ / г, что было в 16 раз выше, чем в контрольной фоновой почве за пределами поселения. При этом численность кератинофильных грибов была только в 3 – 4 раза выше фонового уровня; ее максимальные значения в культурном слое не превышали 11 тыс. КОЕ/г. Высокая численность термофильных бактерий свидетельствует о накоплении стойлового навоза и позволяет определить центральную зону поселения как зону содержания скота.

В юго-западной зоне были изучены два объекта – хозяйственная постройка и почва за ее пределами. За пределами постройки численность термофильных бактерий была в 10 раз выше, чем в фоновой почве, тогда как внутри постройки эта группа микроорганизмов практически не выявлялась. При этом как внутри постройки, так и снаружи, была выявлена максимальная численность кератинофильных грибов – в 6 раз выше фонового уровня. Низкая численность термофильных бактерий внутри постройки указывает на отсутствие навоза, однако высокий уровень численности кератинофильных грибов указывает на то, что сюда поступала шерсть. Есть вероятность, что это помещение использовалось для стрижки овец.

В южной зоне были исследованы два жилища, где численность термофильных бактерий и кератинофильных грибов почти не отличалась от уровня этих показателей в фоновой почве, что указывает на высокие санитарные нормы в жилых домах. Таким образом, по микробиологическим показателям культурных слоев поселения Багай 1 здесь были установлены зона содержания скота, зона хозяйственных построек и жилая зона.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант 22-68-00010

ОЦЕНКА ФРАГМЕНТАЦИИ ЧЕРНОПИХТАРНИКОВ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Дзизюрова В.Д.^{1,2}, Дудов С.В.¹, Петренко Т.Я.², Ахназарова Э.А.², Замуруева В.В.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

dzizyurova.vd@mail.ru

Чернопихтово-кедрово-широколиственные леса юга Дальнего Востока с *Abies holophylla* Maxim. и *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. (чернопихтарники, южный вариант уссурийской тайги) – одна из наиболее богатых лесных экосистем умеренного климата как по числу видов растений, так и по числу экологических ниш. Большая часть чернопихтарников исчезла вследствие рубок и пожаров. По литературным данным, на Дальнем Востоке России малонарушенные чернопихтарники сохранились лишь на территориях заповедников «Кедровая Падь» и «Уссурийский», в заповедной зоне национального парка «Земля леопарда» и в Черных горах вдоль русско-китайской границы.

В мировом сообществе давно признана ценность сохранения биоразнообразия на уровне экосистем, а не отдельных видов. Международным Союзом охраны природы (МСОП) разработаны количественные критерии оценки редкости и уязвимости экосистем. В качестве одного из критериев может выступать уровень фрагментации ландшафтов. Препятствуя расселению и миграциям особей, ограничивая обмен генетическим материалом, фрагментация ведет к снижению биоразнообразия.

Мы рассчитали степень фрагментированности чернопихтарников Дальнего Востока на основе снимков Landsat-8 в программе SAGA с использованием индексов плотности (П) и связанности (С) лесов. Индексы рассчитывались с использованием алгоритма «скользящего окна» с перекрытием окон, размер окна 9×9 пикселей. Для индекса плотности учитывалась доля пикселей в окне, относящихся к данному типу леса, для индекса связанности – доля соседних пар пикселей в окне, где оба пикселя являются лесом. Выделили 8 уровней фрагментации: «ядро» ($P = C = 1$), «внутренний край» ($P = 1$ и $P - C > 0$), «неопределенный уровень» ($P > 0.6$ и $P = C$), «разреженный лес» ($P > 0.6$ и $P - C > 0$), «внешний край» ($P > 0.6$ и $P - C < 0$), «переходный уровень» ($0.4 < P < 0.6$), «участок» ($P < 0.4$) и «не лес» ($P = C = 0$). «Ядра» представляют собой крупные непрерывные участки леса. Пиксели категории «участок» отображаются как участки леса на нелесном фоне. Пиксели категорий «внешний край», «разреженный лес», «неопределенный уровень» и «внутренний край» вместе составляют лесной фон, на котором встречаются участки «не леса». Пиксели категорий «внешний край» и «внутренний край» появляются на внешней и внутренней границе крупных участков леса соответственно.

В результате анализа мы выявили 6 наименее фрагментированных участков чернопихтово-кедрово-широколиственных лесов в пределах дальневосточного ареала. Их расположение соответствует литературным данным: 4 «ядра» находятся Уссурийском заповеднике – 1.5 км², 1 км², 1 км² и 0.7 км² и два на Борисовском плато (заповедная зона национального парка «Земля леопарда») – 2.3 км² и 0.8 км². Полевые работы в Уссурийском заповеднике в августе 2022 г. подтвердили границы «ядер». В пределах территории, оцененной как «разреженный лес» встречались как участки чернопихтарников, так и другие типы леса. Общая площадь всех «ядер» на территории Дальнего Востока России составила 12.4 км². Согласно критериям оценки экосистем МСОП, если площадь экосистемы в пределах ареала составляет менее 200 км², она может быть оценена как «находящаяся на грани полного исчезновения». Однако для достоверной оценки состояния чернопихтовых лесов необходимы дальнейшие исследования.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-24-00098, <https://rscf.ru/project/22-24-00098/>.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ОБРАЩЕНИЯ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ В КОТ-Д'ИВУАРЕ

Диоманде М.Х.Ж.

Российский государственный гидрометеорологический университет,
Санкт-Петербург, Россия

hass.diomande@yahoo.fr

В медицинских учреждениях образуются значительные объемы отходов, негативное воздействие которых на окружающую природную среду и здоровье человека обусловлено наличием в их составе компонентов, представляющих химическую, эпидемиологическую, биологическую или радиационную опасность. Особенно остро проблема обращения с медицинскими отходами стоит в развивающихся странах: по данным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), доля медицинских учреждений, не утилизирующих медицинские отходы должным образом, составляет от 18% до 64%. В странах Африки ключевыми недостатками системы управления медицинскими отходами являются: некорректное использование цветовых кодов и символов маркировки, отсутствие периодического обучения медицинского персонала, сжигание и захоронение отходов без соблюдения требований экологической безопасности.

В работе представлены результаты теоретического исследования, характеризующие систему обращения с медицинскими отходами в республике Кот-д'Ивуар, количество которых в последние десятилетия неуклонно возрастает. По некоторым оценкам, в Кот-д'Ивуаре ежегодно образуется около 4,8 тыс. т медицинских отходов, более 59% которых – инфекционные и опасные. В настоящее время в стране отсутствует единая для медицинских учреждений система управления отходами (сбор-транспортировка-обезвреживание). В основном, отходы складывают на территории медицинских учреждений в выгребных ямах, периодически сжигая, или вывозят на свалки без предварительной сортировки. Захоронение опасных медицинских отходов представляет угрозу для здоровья населения. Отсутствие или несовершенство сортировки отходов повышает их эпидемиологическую и химическую опасность. В некоторых медицинских учреждениях имеются установки для сжигания отходов, являющиеся источником загрязнения атмосферного воздуха. Несоввершенство системы управления медицинскими отходами в Кот-д'Ивуаре является одним из факторов негативного антропогенного воздействия на окружающую среду и здоровье населения. Для решения данной проблемы необходимо принятие законодательных решений на государственном уровне, основанных на мировых научных и технических достижениях в сфере обращения с отходами.

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД
EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS OLIGACANTUS

Золотовская Е.Д., Саранчина А.Е., Дроздова П.Б., Тимофеев М.А.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

zolotovskayaelenad@gmail.com

Озеро Байкал – место обитание впечатляющего разнообразия ракообразных, амфипод. Насчитывается более 350 видов и подвидов, а новые виды продолжают описывать. Амфиподы рода *Eulimnogammarus* широко представлены в озере и относятся к одним из самых полиморфных видов. Вид *Eulimnogammarus verrucosus* является типичным обитателем литорали. У Gurkov A. et al., 2019 было показано разделение этого вида в Байкале на три морфы: западную, восточную и южную. Также, выделяют одну из вариаций *E. verrucosus* – *E. verrucosus oligacantus*. А.Я. Базикалова (Bazikalova, A.Y., 1945) и В.В. Тахтеев (Taxtеев В.В., 2000) по морфологическим признакам определяют эту вариацию как подвид, а Р. Вяйноля и Р.М. Камалтынов выделяют их в отдельный вид по данным аллозимного анализа (Kamaltynov, R., & Vainola, R., 1999). Секвенирование маркерных генов позволит уточнить таксономическую принадлежность этих амфипод.

Целью работы было уточнение таксона байкальских амфипод *E. verrucosus oligacantus* по маркерным генам первой субъединицы цитохром с-оксидазы (COI) и рРНК малой субъединицы рибосомы (18S).

Пробы отбирали на южном и западном побережье Байкала: село Посольское (4 животных); деревня Курма и мыс Уюга (по 2 и 3 животных, соответственно). Для амплификации маркерных генов использовали известные последовательности праймеров. Участки генов COI и 18S секвенировали по методу Сэнгера, данные анализировали при помощи программы Ugene V37.0, филогенетические сети строили в программе SplitsTree4 V4.19.

В качестве референса использовали последовательности генов COI и 18S *E. verrucosus*. Для внешней группы по COI были выбраны виды *E. vittatus*, *Macropereiopus parvus*, по 18S – *M. wagneri*, *G. salinus*, *Parapallasea lagowski*, *Brandtia lata*. Также в анализ были включены последовательности генов 18S и COI *E. verrucosus* из трех байкальских клад и выловленных из реки Ангара. Для сети COI были добавлены последовательности *E. verrucosus oligacantus*, отловленных на берегу Байкала близ мыса Покойники и села Ключевка.

В результате анализа сети по гену 18S было показано, что представители *E. verrucosus oligacantus* выделяются в отдельную от байкальских *E. verrucosus* кладу, внутри которой южные (с. Посольское) животные, обособлены от западных (д. Курма и м. Уюга). Для сети по гену COI были получены аналогичные результаты, при этом животные с м. Покойники попадают в западную группу, из с. Ключевка – в южную.

Подобное разделение внутри *E. verrucosus oligacantus* можно объяснить географическим положением мест отлова. Так, д. Курма, м. Уюга и м. Покойники расположены вдоль западного побережья озера, а с. Ключевка находится относительно недалеко от с. Посольское и располагается на южном берегу Байкала. Также было показано, что животные, отловленные из Ангары и морфологически похожие на *E. verrucosus* близки к западной группе кладу *E. verrucosus oligacantus* по генам COI и 18S.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГУМУСОВО-АККУМУЛЯТИВНЫХ ЭМБРИОЗЕМОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО РУССКО-БУЙЛОВСКОГО ПЕСЧАНОГО КАРЬЕРА

Калинина К.А.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

KalininaKristina83@gmail.com, nkaashirskaya81@gmail.com

Гумусово-аккумулятивные эмбриоземы формируются в условиях техногенных ландшафтов на протяжении 20-25 лет. Целью данного исследования было сравнить биологическую активность эмбриоземов, сформированных на дне песчаного карьера, заброшенного более 20 лет назад. В задачи входило: провести полевое исследование почвенных профилей до глубины 40 см, отобрать образцы почвы по горизонтам, определить численность олиготрофных и сапротрофных микроорганизмов, растущих на твердых питательных средах, провести сравнительный анализ почвенных морфологических и микробиологических показателей на разных участках карьера. Объектами исследования были почвы на четырех участках вдоль трансекты от северного до южного борта карьера, с шагом 10 м.

На первом участке, вблизи северного борта карьера, где проективное покрытие растительности составляло 100 % и преобладали злаки, был изучен профиль гумусово-аккумулятивного эмбриозема. Профиль почвы включал биогенный горизонт, слой гумусированного песка и материнскую породу. Здесь численность как сапротрофных, так и олиготрофных микроорганизмов снижалась с глубиной.

На втором участке встречались очиток, полынь и триния, характерные для сухих местообитаний, значительную часть растительного покрова составляли мох и лишайник. Профиль почвы включал дерновый горизонт, биогенный горизонт и два слоя песчаной материнской породы, между которыми была обнаружена темная гумусированная прослойка с высокой численностью обеих групп микроорганизмов. Вероятно, гумусированная прослойка представляла одну из первых попыток формирования верхнего горизонта и была погребена под слоем песка, в связи с деятельностью водных потоков во время весеннего снеготаяния и проливных дождей.

Третий участок располагался на пути главного водосборного ручья, русло которого заполнялось во время весеннего снеготаяния. Здесь растительный покров был хорошо развит и представлен преимущественно злаками. Профиль почвы включал дерновый горизонт, биогенный горизонт, слой гумусированного песка и материнскую породу. В верхнем слое наблюдалось резкое увеличение численности сапротрофных микроорганизмов.

Четвертый участок заметно отличался от остальных. Разреженный растительный покров в основном был представлен полынью австрийской. В профиле почвы был выделен дерновый горизонт, а биогенный горизонт был слабо оформлен. Поскольку почва формировалась на месте свалки строительного мусора, здесь успел сформироваться только дерново-аккумулятивный эмбриозем. В микробном сообществе преобладали олиготрофные бактерии, что подтверждает особую важность этой группы в формирующихся почвах, где органическое вещество не успело накопиться в достаточном количестве.

Таким образом, на трех участках песчаного карьера были сформированы гумусово-аккумулятивные эмбриоземы, а под южным бортом карьера на культурном слое со следами бытового мусора и кирпича – дерново-аккумулятивный эмбриозем, развитие которого было замедлено в результате антропогенного нарушения.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ РЫЖЕЙ ПОЛЁВКИ В БИОСФЕРНОМ РЕЗЕРВАТЕ «КОЛОГРИВСКИЙ ЛЕС»

Климова А.С.

Костромской государственной университет, Кострома, Россия

Klimova.A.S.ecology@yandex.ru

Сложность и неоднородность протекания популяционных процессов, характер их взаимодействия с постоянно меняющимися условиями внешней среды осложняют выявление закономерностей адапционных изменений, что предполагает дальнейшее детальное и углубленное изучение данного вопроса. В настоящей работе исследованы закономерности популяционной динамики одного из широко распространенных видов цикломорфных грызунов бореально-неморальных и бореальных ельников подзоны южной тайги – *Myodes glareolus* Schreber.

Мониторинговые исследования проведены в летний период 2012–2022 гг. на территории биосферного резервата «Кологривский лес» (43°82'70"N, 58°92'53"E). Отлов грызунов осуществлялся с использованием давилок и живоловок методом ловушко-линий. Всего отработано 9129 ловушко-суток и отловлено 490 особей данного вида. Обработка материала проводилась с использованием факторного анализа и статистических методов с применением пакета программ Microsoft Office Excel и Statistica 10.

Достоверно определена цикличность в динамике численности *M. glareolus*, которая представлена трехлетними циклами, связанными с эндогенными регулирующими факторами ($y = -0,0015x^6 + 0,0527x^5 - 0,6747x^4 + 3,957x^3 - 10,835x^2 + 12,287x - 1,1111$; $R^2 = 0,7311$). Максимальная по величине многолетняя компонента дисперсии составляет 72,11% ($t = 3,79$; $p < 0,01$). Индекс цикличности, отражающий амплитуду колебаний численности, не превышает 0,37. При спектральном и автокорреляционном анализе плотности популяции значимыми оказались периоды в три года. Коэффициент корреляции составляет 0,40. Следовательно, пики численности *M. glareolus* регистрируются каждые три года, в промежутках между которыми происходит спад численности. Кроме того, в исследуемой популяции высота пиков и глубина депрессии в многолетнем периоде претерпевает незначительные изменения во времени, что говорит о зависимости популяционной динамики от внешних воздействий, в частности, от погодных-климатических условий.

Установлена слабая прямая корреляционная зависимость плотности популяции *M. glareolus* от средней температуры воздуха (коэффициент корреляции 0,29) и слабая обратная зависимость от количества осадков (коэффициент корреляции составляет -0,55). Наблюдаемая тенденция говорит о том, что низкие температуры и большое количество осадков могут выступать в качестве лимитирующих факторов и приводить к снижению плотности исследуемой популяции.

Представленные особенности популяционной организации позволяют популяции данного вида поддерживать стабильное состояние в постоянно меняющихся условиях среды. Кроме того, выявленные закономерности позволяют построить прогноз динамики численности *M. glareolus* на рассматриваемой территории. Возможно использование результатов исследования в качестве контрольного примера для сравнения с другими популяциями грызунов в экологически контрастных условиях лесных биоценозов.

РАЗНООБРАЗИЕ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ВОДНЫХ И ПОЧВЕННЫХ СООБЩЕСТВАХ КУЛУНДИНСКОЙ СТЕПИ

Косякова А.И.^{1,2}, Самылина О.С.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, Россия

AnastasiaaKosyakova@yandex.ru

На территории Кулундинской степи, расположенной на юге Западно-Сибирской равнины, сосредоточено огромное количество озер с различной минерализацией и химическим составом. Минерализованные озера – чрезвычайно динамичные системы. В разные сезоны и из года в год количество растворенных солей в одном и том же озере может меняться в широком диапазоне значений. Общая соленость напрямую влияет на видовой состав микробных сообществ. Так, при засолении видовое разнообразие уменьшается, а при рассолении – увеличивается.

Содовые озера являются двойными экстремальными местообитаниями, для которых помимо высокой общей солености характерны стабильно щелочные значения pH (более 9), обусловленные высоким содержанием растворенных карбонатов. Содовые озера Кулундинской степи, начиная с 30-х гг. XX в., вызывают интерес у микробиологов как высокопродуктивные экосистемы с уникальным разнообразием микроорганизмов.

Целью данной работы было изучение разнообразия цианобактерий в фототрофных сообществах минерализованных озер содового типа и прилегающих к ним почв на примере двух озер: Танатар VI и Петуховское. Для этого проводилось микроскопическое изучение природных образцов, собранных в июле 2022 г. Идентификацию цианобактерий проводили с использованием морфологических определителей.

В период сбора образцов общая минерализация (ОМ) оз. Танатар VI составила 34 г/л, общая щелочность (ОЩ) – 0.35 моль-экв/л, pH 9.8; оз. Петуховского – ОМ 60 г/л, ОЩ 0.74 моль-экв/л, pH 10.2. Цианобактерии развивались в составе планктонных, донных и эпифитных фототрофных сообществ в воде озера. Кроме того, на прилегающих почвах были обнаружены цианобактериальные и водорослевые обрастания в виде пленок между зарослями солянковой растительности. Суммарно в водных фототрофных сообществах оз. Танатар VI было выявлено 19 морфотипов цианобактерий, в почвенных корках – 9; в водных сообществах оз. Петуховского – 13, в почвенных корках – 4.

В планктонном сообществе озера Танатар VI доминировали *Limnospira* (ранее *Arthrospira*) *fusiformis* и *Anabaenopsis issatchenkoi*. В эпифитных сообществах преобладали либо цианобактерии (гетероцистные *Nostoc* cf. *punctiforme*, *N.* cf. *paludosum* и нитчатые негетероцистные *Leptolyngbya* cf. *tenuis*), либо нитчатая зеленая эукариотическая водоросль *Ctenocladus circinnatus*. В почвенных обрастаниях доминировали цианобактерии, в первую очередь *N.* cf. *punctiforme* и *Leptolyngbya* cf. *tenuis*.

В планктонном сообществе Петуховского озера преобладали гетероцистные цианобактерии *A. issatchenkoi*, и отмечены диатомовые водоросли. Донные сообщества представляли собой рыхлую биомассу, в которой преобладали *C. circinnatus* и разнообразные нитчатые негетероцистные цианобактерии (*Sodalinema* sp., cf. *Halomicronema* sp., *Nodosilinea* sp., cf. *Leptolyngbya* sp. и др.). В почвенных обрастаниях доминировали эукариотические зеленые и диатомовые водоросли, а среди цианобактерий преобладали *Phormidium etoshii*, *Nodosilinea* sp., cf. *Leptolyngbya* sp.

Таким образом, был изучен состав фототрофных сообществ озер Танатар VI и Петуховское при относительно невысокой минерализации (34 и 60 г/л). Выявлены существенные изменения в составе фототрофных микроорганизмов по сравнению с опубликованными данными за 2011-2012 гг., когда оба озера имели значительно более высокую соленость (Петуховское – 100-200 г/л, Танатар VI – 160-250 г/л).

Работа выполнена при поддержке проекта РФФ № 22-14-00038.

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭМБРИОЗЕМОВ БОЛЬШОГО ПЕСЧАНОГО КАРЬЕРА В СЕЛЕ РУССКАЯ БУЙЛОВКА

Кривчикова М.М.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

dKrivchikova05@mail.ru, nkashirskaya81@gmail.com

Известно, что инициальные эмбриоземы обладают высокой биологической активностью. Ранее нами было показано, что в августе численность микроорганизмов в пятилетних эмбриоземах, сформированных на дне песчаного карьера была заметно выше, чем в верхнем слое контрольных залежных почв в окрестностях карьера. Целью данной работы было продолжение сезонных микробиологических исследований инициальных эмбриоземов большого песчаного карьера в селе Русская Буйловка Павловского района Воронежской области. Для этого был проведен сравнительный анализ микробиологических показателей эмбриоземов и залежных почв в весенний и летний сезоны. В качестве ключевых участков были выбраны подножие восточного борта карьера, склоны рекультивационной насыпи и берег водоема в центре карьера. Залежные почвы вокруг карьера были исследованы на двух участках. Образцы почв отбирались в мае и августе. На почвенном агаре оценивалась численность олиготрофных микроорганизмов, которые представляют наиболее показательную группу в почвах с низким содержанием органического вещества.

Образцы летнего отбора, как правило, характеризовались высокой долей грибных КОЕ на почвенном агаре, до 70% от суммарной численности всех колоний. В образцах весеннего отбора грибные колонии на почвенном агаре практически не выявлялись. На дне карьера в аккумулятивной зоне под восточным бортом, на рекультивационной насыпи и в окрестностях водоема численность олиготрофных бактерий в мае оставалась выше, чем на сухих песчаных участках без рекультивации, однако даже самые высокие ее значения снижались до уровня залежных почв, который в меньшей степени зависел от сезона и составлял около 20 млн КОЕ/г почвы.

Мы полагаем, что в эмбриоземах значительное увеличение численности микроорганизмов в августе связано с тем, что здесь решающее значение имеет влияние растений и их корневых выделений. В мае растительный покров только начинает формироваться, а к августу растения уже успевают произвести накопительный эффект. Вероятно, что в эмбриоземах различие численности между летними и весенними образцами указывает на частичную гибель бактериальных клеток в течение зимы. В устойчивых микробных сообществах залежных почв численность бактерий меньше зависит от сезона, чем в эмбриоземах. Значительная часть микроорганизмов в залежных почвах связана с почвенными агрегатами, которые в эмбриоземах еще не сформировались. Эта часть микробного сообщества приспособлена к неблагоприятным условиям среды и может сохраняться длительное время в состоянии покоя.

ПЕРЕРАБОТКА СУЛЬФИДНОЙ РУДЫ МЕСТОРОЖДЕНИЯ НЮД II С ПОМОЩЬЮ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

Латюк Е.С.¹, Горячев А.А.¹, Булаев А.Г.², Меламуд В.С.²

¹Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ
Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. Виноградского, Москва, Россия

latyuk.es@gmail.com

В Мурманской области сосредоточены значительные запасы важнейших видов минерального сырья, открыто большое количество месторождений сульфидных медно-никелевых руд. При этом на территории области существует ряд месторождений, которые не эксплуатируются из-за низкого содержания ценных компонентов, в том числе из-за небольших запасов. Биовыщелачивание является простым, экологически безопасным и экономически эффективным способом переработки сульфидного сырья.

Целью данной работы являлось проведение лабораторных исследований по определению возможности извлечение Cu и Ni из медно-никелевой руды с помощью метода кучного биовыщелачивания.

В качестве объекта исследования была выбрана руда месторождения Нюд II Мончегорского рудного района. Основные рудные минералы представлены пентландитом, халькопиритом, пирротинном, магнетитом, гематитом. Руда была измельчена до крупности - 5+1 мм. Проба руды №1 (ПР1) содержала 1.97% Ni и 0.54% Cu, проба руды №2 (ПР2) – 0.72% Ni и 0.20% Cu. Для проведения лабораторных экспериментов по кучному биовыщелачиванию

с образцом ПР1 был использован штамм *Acidithiobacillus ferrivorans* NO-37. Для биовыщелачивания ПР2 использовали смешанные культуры ацидофильных микроорганизмов. Испытания с образцом ПР2 проводили в трех температурных режимах: при 25, 35 и 45°C, так как для процессов кучного биовыщелачивания характерен саморазогрев рудного штабеля и важно оценить возможность проведения процесса при разных температурах. Руду ПР1 в перколяторе орошали из соотношения Т:Ж=4:1 (200г руды/50 мл бактериальной суспензии), ПР2 – Т:Ж=1:1.

За исследуемый период из образца ПР1 удалось извлечь 22.5% никеля и 12.7% меди. Значение рН продуктивных растворов изменялся в диапазоне от 1.8 до 2.3, окислительно-восстановительный потенциал 488-608 мВ. Содержание сульфидной серы в твёрдой фазе снизилось на 34.6%.

Извлечение металлов в раствор из образца ПР2 при разной температуре составило при 25°C 18% Ni и 2% Cu, при 35°C 20% Ni и 2.4% Cu, при 45°C 17% Ni и 0.8% Cu. Значения рН продуктивного раствора в первые 20 суток эксперимента были высокими (до 3), и для поддержания рН благоприятного для биовыщелачивания вносили серную кислоту. После этого рН растворов стабилизировался на уровне 2-2.3. Значения Eh в ходе эксперимента варьировались от 540 до 930 мВ. В начале процесса отмечалось снижение значений ниже 600 мВ, и оно оставалось низким до 12 суток (при 25 и 35°C), а затем быстро увеличилось и превысило при 25 и 35°C 900 мВ. При 45°C значения Eh не превышали 800 мВ. Анализ твердой фазы показал, что степень окисления сульфидной серы при 25, 35 и 45°C составила 15, 24 и 25% соответственно.

Результаты проведенных экспериментов показывают возможность проведения длительных процессов биовыщелачивания исследуемой руды для извлечения цветных металлов, при этом больший практический интерес может представлять собой извлечение никеля из-за его более высокой стоимости и более высокой скорости выщелачивания.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛОЩАДНОЙ МАГНИТНОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕОДНОРОДНОСТЕЙ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА СТЕПИ И АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАМЯТНИКОВ

Малышев В.В.¹, Алексеев А.О.¹, Калинин П.И.¹, Горячев И.О.²

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

²Центр палеоэтнологических исследований, Москва, Россия

vladmalyscheff@yandex.ru

С целью развития методов поверхностного зондирования почв выполнен сравнительный анализ площадных и профильных измерений магнитной восприимчивости для учета при мелкомасштабном картировании почв и выделения аномалий, связанных с антропогенным загрязнением или нарушением поверхностного слоя почв. Проведено исследование 3 площадок с черноземами обыкновенными (Calcic Chernozems), черноземами южными (Calcic Chernozems) и светло-каштановыми почвами (Haplic Kastanozems (Endosalic,

Cambic)). Дополнительно на территории Ергенинской возвышенности изучена катена на различных позициях ландшафта (элювиальной, трансэлювиальной, трансэлювиально-аккумулятивной). Результаты площадных измерений магнитной восприимчивости (κ_s) с использованием прибора КТ-20 с датчиком ЗФ-32 (Terraplus) прямо коррелируют ($R^2 = 0.7$) с профильными измерениями в полевых и лабораторных условиях. Показано, что площадной тип съемки κ_s корректно фиксирует объемную магнитную восприимчивость до глубины 30 см. Вариация κ_s на площадках с различными типами почв в основном отражает почвенно-климатическую зональность и пространственную литологическую неоднородность, выраженную в различном гранулометрическом и минералогическом составе слоя 0–30 см на площади 10 × 10 м. Площадная магнитная восприимчивость почв может являться важным дополнительным показателем, способным отразить особенности почвообразующих, литологических и ландшафтных геохимических процессов, происходящих в верхнем слое почвы. Варьирование κ_s на площадках в различных позициях ландшафта происходит под влиянием плоскостного смыва и изменении направленности процессов оксидогенеза железа в зависимости от положения почвенного профиля в рельефе. Комплекс измерений площадной и профильной магнитной восприимчивости может быть использован для мониторинговой оценки влияния климатических изменений на почвы степей, реакции почвы на сельскохозяйственную деятельность человека, ландшафтно-экологических исследований и изучения памятников археологии. Для подтверждения последнего на территории археологического памятника Тешиловского городища была проведена съемка κ_s двух площадок. В результате было получено, что карты распределения κ_s позволяют определить изменения в почвенном покрове, обусловленные древней деятельностью человека.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ СЕДИМЕНТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГРАНУЛОМЕТРИЧЕСКОГО СОСТАВА РАЗНЫХ ТИПОВ ПОЧВ

Масликова С.В.¹, Горбунова Н.С.¹, Ходжаева А.К.²

¹Воронежский Государственный Университет, Воронеж, Россия

²Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

sveta.maslikova.01@mail.ru

Гранулометрический состав – важная характеристика, определяющая такие почвенные свойства как плотность, порозность, водопроницаемость, фильтрацию, влагоемкость, а также водный, тепловой режимы, плодородие и др. Это одна из базовых количественных характеристик при проведении описания и оценке различных почв. Для определения гранулометрического состава используют ряд методов, среди которых широкое распространение получили методы отмучивания почвенных частиц в стоячей воде (методы седиментометрии). Применение этих методов основано на законе Стокса, связующего радиус частиц и равномерную скорость их оседания в жидкости известной вязкости и плотности при известной плотности твердой фазы самих частиц. Многочисленные сравнения методов седиментометрии и, например, лазерной дифрактометрии, все чаще используемой в почвенных исследованиях, говорят не в пользу первых. Однако они до сих пор остаются

востребованными, особенно в нашей стране, что объясняется простотой их выполнения, невысокими материальными затратами и существующими классификационными и методическими подходами, разработанными на их основе. Целью работы было сравнение результатов определения гранулометрического состава в образцах разных типов почв, полученных с использованием измерительной системы PARIO компании METER Group (США) и наиболее часто применяемого пипеточного метода Качинского-Робинсона-Кехля. Сравнение двух методов проводили на образцах 10-ти типов почв, было проанализировано 23 образца в трехкратной повторности. Пробоподготовку выполняли одинаково для обоих методов. Почвенный ряд для проведения сравнения подбирали так, чтобы образцы различались по гранулометрическому составу, а также содержанию органического вещества, карбонатов, железа, легкорастворимых солей и гипса, наличие которых, оказывает агрегирующее действие и может исказить результаты анализа или даже сделать невозможным его выполнение. Проведенное нами сравнение показало, что использование измерительной системы PARIO имеет как ряд преимуществ перед пипеточным методом, так и недостатки. К преимуществам в первую очередь относятся скорость и частичная автоматизация анализа, что упрощает его выполнение. К недостаткам – возможность использования только двух классификаций почвенных частиц (Германии и США) и большее количество образца, необходимого для проведения анализа. Оценка воспроизводимости результатов гранулометрического состава позволяет сделать вывод о том, что совокупность случайных погрешностей, начиная от пробоподготовки образцов и заканчивая выполнением анализов, при использовании пипеточного метода в большинстве случаев не превышала 18% от среднего, при использовании измерительной системы PARIO 30%. Полученный коэффициент корреляции между результатами измерений, выполненных сравниваемыми методами, составил 0.94, что говорит о тесной корреляционной связи между ними. Средние значения содержания фракций крупного, среднего и мелкого песка, тонкой пыли и ила значимо не различались ($p > 0.05$). Однако для фракций крупной и средней пыли такая оценка показала значимые различия, т.е. расхождение между методами существенное. Следует отметить, что только половина из исследованных почвенных образцов по результатам определений гранулометрического состава сравниваемыми методами получили одну и ту же классификационную принадлежность.

АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ *BACILLUS SUBTILIS* ОКАЗЫВАТЬ РОСТСТимулирующее ДЕЙСТВИЕ НА РАСТЕНИЯ ОЗИМОЙ РЖИ В ПРИСУТСТВИИ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА

Матюнина В.Д.

Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

victori.ma0307@gmail.com

Современные интенсивные технологии возделывания пшеницы включают обязательное использование гербицидов. При этом культурные растения испытывают гербицидный стресс, что ведет к потере урожая и снижению качества зерна. Одним из способов решения этой проблемы является использование ростстимулирующих бактерий рода *Bacillus*, образующих споры и поэтому в определенной степени резистентных к действию

агрохимиката. Применение бактериальных препаратов совместно с гербицидами позволяет значительно сократить расходы на обработку полей. При этом важно, чтобы бактерии сохраняли жизнеспособность в присутствии гербицида, не разрушая его действующее вещество. Цель исследования – анализ способности бактерий *B. subtilis* оказывать ростстимулирующее действие на растения озимой ржи в присутствии гербицидного стресса без утраты функциональной активности гербицида в баковой смеси.

Объектами исследования служили ростстимулирующие бактерии *B. subtilis* штаммы 10-4 (ВКПМ В-12988) и 26Д (016-02-2491-1), семена озимой ржи сорта Маруся и сорных растений, собранных с урожаем семян ржи, системный гербицид Деймос (АО Август). Семена растений инокулировали бактериями в дозе 10^9 кл./мл из расчета 100 мкл/ 1 г семян, на фоне малой (10 мл/3л) и большой (20мл/3л) доз гербицида и проращивали 7 дней на бумажных фильтрах. Анализировали энергию прорастания, всхожесть, количество и длину корней, длину побега растений ржи, а также всхожесть сорных растений. Численность бактерий при культивировании в термостатируемом шейкере учитывали в течение 5 дней.

Выявлено, что численность бактерий в растворе гербицида поддерживалась на исходном уровне. Биологическая эффективность гербицида сохранялась на уровне 86-90%. Различия по всхожести сорных растений, обработанных гербицидом и комбинированным с бактериями гербицидным препаратом, были статистически не значимыми, что свидетельствует о слабом влиянии бактериального компонента на свойства гербицида. На фоне малой дозы гербицида оба штамма в 1,5-1,6 раз стимулировали рост побегов проростков ржи, при этом штамм 10-4 оказал также положительное влияние и на рост корней. Большая доза гербицида значительно подавляла рост корней проростков ржи, антистрессовое действие бактерий распространялось только на рост побега.

Работа выполнена при финансировании гранта УМНИК 18250ГУ/2022.

ДИНАМИКА ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП ОЗЁРНОГО ПЛАНКТОНА И
ЗАКОНОМЕРНОСТИ КОЛЕБАНИЙ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК, ДИНАМИКИ
ХАРАКТЕРИСТИК ТРОФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
ПЛАНКТОННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Минаев И.С., Минаев Н.С., Медвинский А.Б., Нуриева Н.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ФГБУН,
Пушино, Россия

tornadosteem3@hmozma.pro

Как известно, две трети всего кислорода на земле производится озёрным и океаническим планктоном. Планктон является наиважнейшим начальным звеном в пищевой цепи. Без планктона жизнь в водных экосистемах, а вместе с ней и сухопутная, в том виде в котором мы её знаем, будет невозможна. Мониторинг популяций в реальной среде, а также математическое моделирование динамических характеристик планктона, позволяет установить и раскрыть ряд фундаментальных закономерностей функционирования водных экосистем и планктона, в частности.

Материалами работы являются данные полевых исследований, проведенных сотрудниками Белорусского государственного университета. Исследователи измеряли ряд абиотических факторов, а также биомассу таксономических групп планктона в системе трёх озёр: Нарочь, Мястро, Баторино.

В результате работы получена численная оценка влияния антропогенных факторов и биологической инвазии на изменение корреляции между динамикой биогенов и колебаниями таксономических групп фитопланктона Нарочанских озёр. В результате антропогенного вмешательства наблюдается рост популяции цианобактерий из-за высокого содержания биогенных веществ (фосфора и азота). В результате биологической инвазии и изменения антропогенной нагрузки наблюдаются изменения корреляций между колебаниями концентрации биогенов и колебаниями обилия гидробионтов. Получена численная оценка изменения динамики таксономических групп фитопланктона в результате антропогенных воздействий и биологической инвазии.

С помощью моделирования динамики планктона методом, который предполагает непосредственное включение данных мониторинга в математическую модель динамики планктонного сообщества, получено решение этой модели в виде временного ряда, характеризующего динамику трофической функции зоопланктона и определено соответствие полученного решения аналитическим представлениям трофических функций известных из литературы.

Результаты дальнейших исследований позволят точнее выявить влияние антропогенных факторов и биологической инвазии на функционирование экосистемы Нарочанских озёр, приведут к лучшему пониманию механизмов, определяющих динамику популяций озёрных гидробионтов, помогут в создании новых подходов в согласовании полевых исследований, направленных на мониторинг системы Нарочанских озёр, и исследований, направленных на анализ полученных в результате мониторинга данных. Также, результаты работы могут использоваться для интерпретации данных мониторинга водных экосистем.

ВЛИЯНИЕ ФЛОРЫ И ФАУНЫ НА МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЛУГОВО-ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВ

Нагорнова Г.В.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

monbt.gaby@mail.ru, nkashirskaya81@gmail.com

Прекращение выпаса скота приводит к смене растительного покрова пойменных лугов, причем на некоторых участках фиторазнообразие снижается до одного доминирующего вида. Целью нашей работы было сравнить биологическую активность почв на участках пойменного луга под монодоминантной растительностью и на типичных луговых участках. В задачи входило: выбрать участки и определить доминантные виды растений, асептически отобрать образцы почвы из прикорневого слоя, определить численность сапротрофных и олиготрофных бактерий и грибов. Отдельной задачей было исследование образца почвы из муравейника.

Образцы почвы под монодоминантной растительностью отбирали из прикорневого слоя следующих видов: льнянка обыкновенная *Linaria vulgaris*, просвирник лесной *Malva sylvestris*, ястребинка зонтичная *Crepis umbellata*, осот полевой *Sonchus arvensis*, череда трехраздельная *Bidens tripartita*. Два участка с преобладанием череды трехраздельной относились к территории зарастающего озера-блюдца. На одном из этих участков был обнаружен слой сухих водорослей, не успевших разложиться после высыхания озера. На типичных участках пойменного луга с разнотравно-злаковой растительностью образцы отбирались под клевером луговым *Trifolium pratense* и лядвенцем рогатым *Lotus corniculatus*. Для оценки влияния насекомых исследовалась почва из муравейника, принадлежащего муравью черному обыкновенному *Lasius niger*.

Численность олиготрофных бактерий, растущих на почвенном агаре, была выше контрольного уровня только под мальвой и снижалась на лугу в ряду мальва – льнянка – ястребинка – осот. На дне сухого озера, где сохранились остатки водорослей, их численность увеличивалась до уровня контроля. Численность сапротрофных бактерий, растущих на богатой среде, была на лугу во всех случаях ниже верхнего уровня контроля. Можно отметить, что снижение растительного разнообразия в большей части случаев приводило к уменьшению численности микроорганизмов, по сравнению с типичными участками пойменного луга.

На дне зарастающего озера под чередой в слое разлагающихся водорослей преобладали сапротрофные бактерии, их численность была в 3.5 раза выше, чем на типичном участке луга под лядвенцем, и в 30 раз выше, чем под чередой на окраине озера.

В почве муравейника была обнаружена чрезвычайно высокая численность сапротрофных грибов, подавляющих рост сапротрофных бактерий. Очевидно, это связано с жизнедеятельностью муравьев. Есть предположение, что многие муравьи, а также другие насекомые способствуют росту микроскопических грибов-детритофагов, которые помогают им усваивать труднодоступное органическое вещество растительной подстилки.

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ КАРТОФЕЛЯ БИОПРЕПАРАТАМИ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ НА УРОЖАЙ КЛУБНЕЙ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ

Павлова О.А.¹, Гарипова С.Р.^{2,3}, Пусенкова Л.И.²

¹Гимназия № 121, Уфа, Россия

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

³Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

olgapav02@yandex.ru

Картофель – важнейшая сельскохозяйственная культура на территории РФ. В экологически сбалансированных агроэкосистемах для получения высоких урожаев сельскохозяйственных культур внедряются устойчивые к неблагоприятным абиотическим факторам и болезням сорта, а также применяются биопрепараты на основе полезных микроорганизмов, в том числе на основе эндофитных бактерий. Известно, что эндофиты могут системно распространяться внутри растений, но не ясно, могут ли они передаваться

последующим поколениям при вегетативном размножении у растений картофеля. Возникает вопрос: будет ли сохраняться последствие применения препаратов эндофитных бактерий на урожай картофеля и устойчивость к болезням клубней следующего поколения. Целью исследования являлось изучение влияния однократной и двукратных бактериальных обработок картофеля на рост, урожай и устойчивость к болезням картофеля второго поколения в условиях мелкоделяночного полевого опыта с мини-клубнями и настоящими клубнями, полученными при выращивании растений в поле.

В мелкоделяночных полевых экспериментах, проводимых на серой лесной почве в условиях Северной лесостепи Южного Урала в 2021-2022 гг., использовали сорт картофеля Удача, штаммы бактерий *Bacillus subtilis* 26Д и 10-4. В опыте с мини-клубнями выявлено, что обработка растений картофеля 1-го поколения штаммами 26Д и 10-4 оказала положительное влияние на урожай растений 2-го поколения: прибавки в массе клубней в среднем с куста составили 53 и 215% соответственно по сравнению с необработанным бактериями контролем. Дополнительная бактериальная обработка вегетирующих растений 2-го поколения не сказалась на урожае клубней. В опыте с настоящими клубнями однократная предпосадочная обработка родительских клубней была неэффективной для растений второго поколения, однако двукратная обработка (предпосадочная и обработка по вегетации на стадии бутонизации) родительских растений штаммом 10-4 привела к увеличению на 29% урожая картофеля следующего поколения и повышению устойчивости клубней к болезням по сравнению с контролем без инокуляции и обработкой эталонным штаммом 26Д.

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БИОАНАЛИТИЧЕСКОГО УСТРОЙСТВА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА ОСНОВЕ БИОПЛЁНОК АКТИВНОГО ИЛА

Перчиков Р.Н.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, лаборатория биологически активных соединений и биокомпозитов, Тула, Россия

Perchikov_roma@mail.ru

Биохимическое потребление кислорода (БПК) является одним из показателей для контроля чистоты водных сред и обозначает то количество кислорода, которое необходимо для биохимического окисления органических веществ, содержащихся в пробе воды. Используемый стандартный метод для определения БПК установлен международным стандартом ISO 5815-1:2003, существенным недостатком которого является продолжительность анализа – 5 суток. За данный промежуток времени может произойти существенное загрязнение в исследуемых водоёмах, что может привести к экологической катастрофе из-за несвоевременной детекции. В связи с этим вырастает актуальность создания датчиков, которые за короткий интервал времени могут проводить анализ в полевых условиях. Одним из подходов к решению данного вопроса является создание биосенсоров на основе микроорганизмов – они могут окислять широкий круг органических субстратов за несколько минут.

В нашей работе был использован новый подход к созданию и формированию биосенсоров – выращивание биоплёнки на поверхности графито-пастовых электродов в отличие от ранее используемого метода нанесения суспензии. Доказательство образования биоплёнки проводили комплексом методов: сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), лазерной конфокальной сканирующей микроскопией (ЛКСМ) и оптической микроскопией. Физиологическую активность микроорганизмов в биопленках определяли с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест). При создании биосенсоров на основе активного ила удалось достичь нижней границы $0,29 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$, широкого диапазона окисляемых субстратов, долговременной стабильности – 52 дня, а также времени анализа в 5 минут.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания по теме "Синтез таргетных биологически активных ионных соединений и новых биокompозитных материалов" (FEWG-2021-0011)

ВОЗОБНОВЛЕНИЕ ДЕРЕВЬЕВ В ОКНАХ ДРЕВОСТОЯ ЧЕРНОПИХТОВО-КЕДРОВО-ШИРОКОЛИСТВЕННЫХ ЛЕСОВ ЮГА ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Петренко Т.Я.¹, Замуруева В.В.^{1,2}, Дзизюрова В.Д.¹

¹Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

²Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток, Россия

petrenkotya@gmail.com

Чернопихтovo-кедрovo-широколиственные леса (ЧКШЛ) – редкие, но крайне ценные сообщества, распространенные на самом юге Дальнего Востока. В настоящее время эти сообщества сильно фрагментированы и сохранились лишь на особо охраняемых природных территориях. Участвовавшие тайфуны стали причиной образования большого количества ветровальных окон в пологе древостоя. В данной работе мы исследовали возобновление деревьев в окнах в пологе ЧКШЛ в результате тайфуна Майсак (2020 г).

Исследование проводилось на территории заповедника «Уссурийский» им. В.Л. Комарова. В результате наземных исследований было описано 11 окон, через каждое была заложена трансекта шириной 2 метра с севера на юг. Начало и конец каждой трансекты находились под пологом древостоя. Для каждого окна были отмечены его длина и ширина, количество деревьев, образовавших окно, и их вид. В каждом окне учитывались все особи деревьев в возрасте от 2х лет до 3 метров высотой, а также их положение относительно окна (под пологом/на границе окна/в окне).

Возраст исследуемых окон не превышает 3-х лет. Все нарушения относятся к мелкомасштабным, их площадь от 65 до 125 м², окна образованы вывалами от 1 до 4 деревьев. При этом на снимке, полученном на данной территории с помощью беспилотного летательного аппарата, видно, что встречаются и более крупные нарушения, образованные 10 стволами деревьев.

Всего нами было учтено 2307 особей, относящихся к 28 видам. 74% всего подроста относится к двум светолюбивым видам деревьев – *Ligustrina amurensis* Rupr. (40%) и *Fraxinus*

mandshurica Rupr. (34%), которые представлены главным образом имматурными растениями до 50 см в высоту. Доля остальных видов не превышает 3.5%. Во всех окнах произрастают особи *F. mandshurica*, в 10 окнах – *Acer mono* Maxim. ex Rupr. Из хвойных видов были встречены *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc., *Abies holophylla* Maxim. и *Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim., но доля каждого вида менее 1%. *P. koraiensis* и *A. holophylla* представлены лишь маленькими особями до 50 см в высоту, *A. nephrolepis* наоборот в большей части выше 150 см.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-24-00098.

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ В ПОЧВАХ ГОРНОЙ ЗОНЫ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАВКАЗА

Петросян А.А.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Россия

Alisa_Mayakovskaya@bk.ru

Основная отрасль сельского хозяйства в горных районах – животноводство на богатых альпийских и субальпийских пастбищах. Экосистемы пастбищ покрывают примерно 30% поверхности суши в мире и обеспечивают многие важнейшие экосистемные услуги, такие как секвестрация С и N, первичная продукция, поддержание разнообразия экосистем и др. Однако последствия исключения выпаса скота на пастбищные экосистемы в горных почвах Центрального Кавказа остаются малоизученными. Поэтому очень важно понимать влияние исключения выпаса скота на ключевые свойства почв этих пастбищных экосистем. В связи с этим, **цель** нашего исследования заключается в сравнение биологической активности на естественных и антропогенно-преобразованных почвах в условиях горной зоны Центрального Кавказа

Объекты исследования располагались в Карачаево-Черкесской и Кабардино-Балкарской Республике. Абсолютная высота 2100-2300 м. Исследовались почвы на склонах северной экспозиции и на локальном водоразделе на двух объектах: почва без пастбищной нагрузки, и почвы пастбищ, с умеренным выпасом скота. Образцы были отобраны на водоразделе, под луговой растительностью, на границе луга и леса, и под лесной растительностью. Тип почв – горно-луговой черноземовидный. Были выполнены определения содержания активности фермента фосфатазы, уреазы, рассчитана микробная биомасса, определены общий углерод, азот, рН.

Статистическую обработку результатов проводили методом главных компонент. Фактор 1 объяснял 70% общей дисперсии и с ними связаны фосфатазная активность и общий азот, фактор 2 объяснял 14% общей дисперсии, основной вклад вносил показатель рН. Биологическая активность максимальная была в почвах пастбищ, на границе луга и леса. Почвы пастбищ под луговой растительностью так же были приближены к максимальным значениям и образовали две отдельные группы. Максимумы почв без выпаса скота на границе луга и леса совпали с минимумами почв пастбищ под лесной растительностью и образовали отдельную группу.

Влияние выпаса скота на химические показатели почв были не ярко выражены, в то время как биологические характеристики сильно отличались друг от друга. Отношение C/N и нитратного азота к аммонийному демонстрирует высокую обогащенность почв азотом и высокая доступность азота для микроорганизмов и растений. Поэтому в почвах на границе леса и луга происходит накопление нитратных форм азота. Для микробного сообщества почв пастбищ под лесной растительностью и почв без выпаса скота на границе луга и леса было характерно наименьшее содержание доступного фосфора растениям. Микробная биомасса максимальная была на границе луга и леса на обоих объектах. Почвы пастбищ характеризуется повышенной биологической активностью, по сравнению с почвами без выпаса скота. Данное увеличение связано с дополнительным привнесом в почву животных экскрементов. Таким образом, умеренный выпас скота не приводит к деградации почвенного покрова.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ №20-59-05001

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЕРХНЕГО СЛОЯ ПОЧВ ПРИРОДНЫХ И АНТРОПОГЕННЫХ ЛАНДШАФТОВ ГОРОДСКОГО ОКРУГА ПУЩИНО

Сапронов Н.Д.¹, Журавлёва А.И.², Сапронов Д.В.²

¹Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение гимназия «Пушино»,
Пушино, Россия

²Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

nikola.wolk.1@gmail.com

Проблема экологии городских территорий приобретает в настоящее время все большую актуальность потому, что город изменяет почти все компоненты природной среды: атмосферу, растительность, почву, рельеф, грунты, подземные воды и даже климат. Выделение CO₂ и ферментативная активность (на примере бета-глюкозидазы) позволяет оценить биологическую активность почвы и говорить о здоровье и состоянии городских экосистем.

Цель работы – оценка и сравнение биологической активности верхнего слоя почвы, в зависимости от антропогенной нагрузки или вида землепользования. Гипотеза – биологическая активность верхнего слоя почвы в природных и антропогенно-преобразованных ландшафтах различна.

Исследования проводились с использованием верхнего 0-5 см слоя серой лесной почвы под естественными ценозами (лиственный лес и разнотравно-злаковый луг) и под антропогенно-преобразованными аналогами в черте городского округа Пушкино (парк, газон, клумба, огород, пашня). Скорость выделения CO₂ определяли в инкубационном эксперименте с использованием газовой хроматографии, а активность ферментов оценивали методом меченных субстратов.

Мониторинг дыхательной активности почвенных образцов позволил разделить исследуемые ценозы на две группы. Первая группа – это пашня, огород и клумба, а вторая

группа – лес, парк, газон и луг. Представители этих групп имели сходные величины внутри группы, но различались между группами. Ценозы первой группы имели значения эмиссии CO₂ от 1,5 до 2,5 мкг углерода на 1 г почвы в час, а второй от 6,5 до 8 мкг углерода на 1 г почвы в час. Следовательно, можно утверждать, что характер землепользования, тип растительности и зрелость ценоза являются определяющими факторами для величины продуцирования углекислого газа.

Установлено, что активность глюкозидазы в интенсивно возделываемых почвах увеличивалась в ряду: огород-пашня-клумба-парк-газон. Выявлено, что активность бета-глюкозидазы в почве под лугом и в огородной почве близки, но вдвое ниже её активности в почве под лесом. В целом активность глюкозидазы хорошо коррелировала с эмиссией CO₂ из почвы, отражая реакцию микробного сообщества на характер антропогенной нагрузки.

Полученные результаты дают основание полагать, что в городском округе Пушино антропогенная нагрузка и загрязнения не имеют критических значений, и не оказывают существенного влияния на ценозы, преобразованные человеком.

ПОЧВЕННАЯ МИКОБИОТА УРБООКОСИСТЕМ РОССИЙСКОЙ СУБАРКТИКИ (НА ПРИМЕРЕ г. МУРМАНСК)

Сошина А.С.¹, Корнейкова М.В.^{1,2}

¹Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального
исследовательского центра «Кольский научный центр Российской академии наук»
(ИППЭС КНЦ РАН), Апатиты, Россия

²Аграрно-технологический институт Российского университета дружбы народов
(АТИ РУДН), Москва, Россия

anastasiya.soshina97@yandex.ru

Актуальность изучения арктических регионов растет быстрыми темпами в связи с чувствительной реакцией хрупких экосистем в условиях изменения климата и возрастающей антропогенной нагрузки. Экологические последствия урбанизации особенно заметны в арктических регионах, где восстановление и развитие экосистем ограничивается климатическими и почвенными условиями.

Микроорганизмы, в том числе микроскопические грибы, – наиболее отзывчивая на изменения в экосистемах часть почвенной биоты. Они отвечают за многие важные функции и экосистемные услуги, включая минерализацию органического вещества, поддержание круговорота питательных веществ и биоразнообразия. Целью настоящей работы стало изучение количественных и качественных параметров сообществ культивируемых микроскопических грибов в почвах г. Мурманска (68,967 с. ш., 33,083 в. д.), который считается самым большим арктическим городом в мире.

Образцы почв отбирали по горизонтам с двух участков, расположенных в городской черте (Urbic Technosols (Arenic) по WRB) и с фонового участка в естественной лесотундровой зоне (Folic Leptic Albic Podzol (Arenic) по WRB). Численность колониеобразующих единиц

(КОЕ) и разнообразие культивируемых микромицетов определяли методом микробиологического посева на среду сусло-агар с добавлением молочной кислоты (4 мл/л) для ингибирования роста бактерий. Представленность видов оценивали по показателю относительного обилия видов.

Количество микромицетов в верхних горизонтах исследуемых почв составляло 4×10^3 до 19×10^4 КОЕ/г почвы. Минимальная численность отмечена для городских почв; максимальная – для почвы лесотундры. В исследуемых почвах отмечено уменьшение КОЕ на несколько порядков от органогенного горизонта к нижележащим, что в принципе характерно для почв Кольского п-ова.

Видовое разнообразие культивируемой части грибного сообщества исследуемых почв представлено 33 видами из 15 родов, относящихся к двум отделам *Mucoromycota*, *Ascomycota* и анаморфным грибам (в том числе и три типа стерильных форм мицелия). Максимальное количество видов выделено из фоновой почвы лесотундровой зоны – 20 видов. В органогенном горизонте фоновой почвы доминировали грибы рода *Umbelopsis* (*U. ramanniana* и *U. isabellina*) с индексом обилия 38%. В нижележащих слоях встречались грибы родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Tilachlidium*, *Trichocladium*, *Trichoderma*, *Umbelopsis* и один тип стерильного мицелия. В урбанизированных почвах выделено 12-16 видов микроскопических грибов. В органогенном горизонте почв городских участков отмечено доминирование грибов рода *Trichoderma* (*T. hamatum* и *T. viride*) с индексом обилия 33-36%. В нижележащем погребенном гумусово-аккумулятивном горизонте в почвах городских участков доминирует *Trichocladium griseum* – типичный фитопатоген и целлюлозолитик – с индексом обилия 47-76%.

Таким образом, количественные и качественные параметры микокомплексов почв урбозосистем субарктической зоны Кольского п-ова существенно отличаются от фоновых лесотундровых почв.

Работа выполнена в рамках ГЗ ИППЭС КНЦ РАН № 1021051803684-1.

ЗАВИСИМОСТЬ ГЕТЕРОТРОФНОГО ДЫХАНИЯ ТОРФЯНЫХ ПОЧВ СЕВЕРНОЙ И ЮЖНОЙ ТАЙГИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ

Трифорова В.А.

Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

victoriatrifonova04@gmail.com

Торфяные почвы принято считать потенциальным источником прироста CO_2 в атмосфере. Болота содержат около 30% мирового запаса органического углерода в метровой толще (Global Peatland Database, 2021). При нарушении гидротермического режима торфяных почв может начаться ускоренная деградация органического вещества, наиболее уязвимы к этим изменениям почвы криолитозоны.

Целью данной работы является обнаружение влияния смены температурного и водного режима на гетеротрофное дыхание почв.

Исследования проводились в поле и в лаборатории. Для полевого эксперимента были выбраны торфяные почвы двух термокарстов с разной степенью разложения торфа. Исследовался контур вокруг термокарстов с ненарушенным сезонно-талым слоем (сухой и холодный участок) и две трансекты через термокарст (мокрый и теплый участок). Для лабораторных исследований были выбраны торфяно-криозем типичный (северная тайга, мерзлота на глубине 60 см) и торфяная олиготрофная типичная (южная тайга) почвы. Поддерживалась постоянная температура 5, 15 и 25°C и 30, 60, 80 и 100% влажность (в процентах от предельной полевой влагоемкости).

По результатам полевого исследования, разные гидротермические режимы не влияли в значительной мере на эмиссию CO₂, в среднем, показатели эмиссии фонового участка были в 1,27–1,68 раза выше для термокарста с более разложившимся торфом и в 1,30–2,45 для слабо разложившегося торфяника. В лаборатории показатели микробного дыхания закономерно увеличивались от 5 до 25 °C, при этом показатель температурной чувствительности (Q₁₀) был наибольшим при переходе от 5 к 15°C и при наименьшем значении влажности – 4,16 для торфяно-криозема и 2,75 для торфяной олиготрофной почвы. Статистически значимое влияние температуры подтверждено во всех случаях, влияние влажности только на интервале от 30% до 60% ППВ.

В полевых условиях действует множество разнонаправленных факторов, наличие ММП не только регулирует гидротермический режим, но и перемещение газовой фазы. Оптимум влажности для торфяных почв имеет широкие пределы, а температурная чувствительность максимальная при показателе 5°C.

ФОРМИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ АССОЦИАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ИНДЕКСА БПК И ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД

Харькова А.С.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Anyuta_Zaytseva@mail.ru

Основной задачей исследования является разработка устройства для экспресс-мониторинга индекса биохимического потребления кислорода (БПК) и токсичности, т.к. стандартные методы анализа требуют значительного времени контакта тест-объектов с токсикантами пробы. Использован подход, основанный на применении биоматериала совместно с амперометрическим преобразователем, где аналитический сигнал генерируется с помощью медиаторов. Для формирования безреагентных устройств медиатор фиксировали в составе композитного материала на основе углеродных нанотрубок и редокс-активных полимеров. Для оценки токсичности сформирована ассоциация *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 (*P. yeei*) и *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ Y-1173 (*S. cerevisiae*), а для оценки БПК – ассоциации дрожжей *Ogateae polymorpha* ВКМ Y-2559 (*O. polymorpha*) и *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677 (*B. adenivorans*). Указанные комбинации микроорганизмов характеризуются стабильностью микробного состава в течение 4 и 15 суток, соответственно. Выбраны составы композитов для иммобилизации ассоциаций: модифицированный нейтральным красным БСА

совместно с углеродными нанотрубками (УНТ) для ассоциации *P. yeai* и *S. cerevisiae*, и модифицированный нейтральным красным хитозан и УНТ – для второй ассоциации; установлены рабочие концентрации нейтрального красного 5 мМ и количества биомассы 2,5 мг и 3,3 мг, УНТ 500 мкг и 375 мкг для биорецепторов мониторинга БПК и токсичности, соответственно. Нижняя граница определяемых значений БПК составляет 0,6 мг/дм³, что позволяет проводить анализ проб, значение БПК которых ниже ПДК (4 мг/дм³), время единичного замера 4-5 минут. Система оценки токсичности характеризуется высокой чувствительностью к ионам Ni²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ и к фенолу (концентрации токсикантов, вызывающие снижение активности рецепторного элемента на 50% составляют 9,4; 3,2; 7,6 и 7,5 мг/л, соответственно). Рецепторные элементы прошли апробацию на образцах поверхностных вод, показана высокая корреляция результатов анализа с результатами стандартных методов.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, номер гранта МК-4815.2022.1.4.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ ЕВРО-АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

Чапоргина А.А.¹, Корнейкова М.В.^{1,2}, Мязин В.А.¹

¹Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ РАН, Апатиты, Россия

²Аграрно-технологический институт Российского университета дружбы народов (РУДН), Москва, Россия

a.chaporgina@ksc.ru

В последнее время значение Евро-Арктического региона возрастает в связи с расширением спроса на углеводородные ресурсы. Биоремедиация нефтезагрязненных территорий приобретает особую значимость на Кольском полуострове, где планируется и уже осуществляется строительство мощных комплексов по транспортировке, перегрузке, переработке углеводородного сырья. Поскольку все естественные процессы разложения нефтепродуктов (НП) в арктических широтах замедлены, возрос интерес к экологически безопасным и экономичным методам восстановления почв от нефтяных загрязнений.

Основная цель исследования – изучить влияние биологической очистки (с помощью ассоциаций микроорганизмов) на скорость ремедиации почв Кольского полуострова, загрязненных дизельным топливом в условиях полевого опыта.

На первом этапе работы изучена нефтеокисляющая способность микроорганизмов, выделенных из почв, загрязненных НП (дизельное топливо, мазут, газовый конденсат, отработанное машинное масло). Отобраны штаммы, способные активно окислять углеводороды нефти. К ним относятся следующие виды бактерий: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. baetica*, *Microbacterium paraoxydans* и микроскопических грибов: *Penicillium canescens st.1*, *P. commune*, *P. ochrochloron*, *P. restrictum*, *P. simplicissimum st.1*.

На втором этапе проведена оценка эффективности использования бактериальной, грибной и бактериально-грибной ассоциаций для очистки почв от НП в условиях лабораторных и полевого модельного опытов. Бактериально-грибная ассоциация оказалась наиболее эффективной в разложении НП: за 120 суток содержание НП уменьшилось на 82% (до 12,04 г нефти/кг почвы), при этом скорость разложения НП через 30 и 120 суток была максимальной.

Таким образом, использование ассоциаций аборигенных микроорганизмов – нефтеструкторов ускоряет процесс разложения НП в Al-Fe гумусовой почве на 10-20% и может быть рекомендовано для доочистки субстратов от углеводородов нефти.

Исследование выполнено в рамках темы НИР по Госзаданию 1021051803684-1.

АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ МУЖСКОЙ ГЕНЕРАТИВНОЙ СФЕРЫ СОСНЫ КРЫМСКОЙ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Чугреев М.Ю.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и
биотехнологии, Воронеж, Россия

michael.yurievich@yandex.ru

Сосна крымская (*Pinus pallasiana* Lamb.) – один из интродуцированных видов хвойных, встречающийся в озеленении юга средней полосы России. Важным аспектом изучения приспособленности данного вида к новым условиям произрастания является оценка влияния техногенного загрязнения на состояние его генеративной сферы.

Проведены фенологические наблюдения и исследовано качество пыльцы деревьев из различающихся по степени техногенного загрязнения условий Воронежской области.

В 2022 году пыление изучаемого вида началось поздно – в конце третьей декады мая, при достижении суммы эффективных температур в 330,8°C. Пыление продолжалось 5 дней. В первый день пыления наблюдались осадки, далее было ясно. Микростробилы всех растений сосны крымской были повреждены вредителями, многие прекращали развитие, пыльца в них формировалась с аномалиями или гибла. Деревья из Семилукского района были повреждены вредителями настолько, что не образовали микростробилы вовсе.

Жизнеспособность пыльцы слабо и средне поврежденных образцов при температуре проращивания 27°C была высокой (в среднем 82,7±6,0%). У сильно поврежденного вредителями дерева качество пыльцы было сильно ниже – 44,0±2,4%. Повышение температуры проращивания до 35°C не привело к достоверному изменению числа проросших зерен у большинства образцов – различия укладывались в рамки доверительных интервалов, а Р-значение, полученное при однофакторном дисперсионном анализе составило 0,903. Таким образом, в 2022 году изученные деревья имели высокие показатели адаптационного потенциала. Однофакторный дисперсионный анализ значений жизнеспособности пыльцы, ранжированных по уровням техногенного загрязнения, показал достоверное влияние места произрастания на качество пыльцы: при 27°C $P=1,09 \cdot 10^{-17}$, при 35°C $P=3,42 \cdot 10^{-18}$. Сравнение средних значений жизнеспособности пыльцы за 2020-2022 годы посредством однофакторного

дисперсионного анализа показало отсутствие значимого влияния метеоусловий года на качество пыльцы сосны крымской ($P=0,205$).

Полученные результаты говорят о том, что наибольшее влиянием на состояние мужской генеративной сферы сосны крымской оказывают техногенное загрязнение мест произрастания деревьев, а также повреждение микростробилов вредителями.

ЛУГОВЫЕ ГИДРОМОРФНЫЕ ПОЧВЫ НА ТЕРРИТОРИИ ЗАРАСТАЮЩИХ ОЗЕР ЛЕВОБЕРЕЖНОЙ ПОЙМЫ ДОНА

Шевченко П.Г.¹, Каширская Т.П.¹, Каширская Н.Н.²

¹МКОУ Русско-Буйловская СОШ, с. Русская Буйловка, Россия

²ИФХиБПП РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

tnsh77@mail.ru, nkashirskaya81@gmail.com

Известно, что после прекращения выпаса скота происходит зарастание заброшенных пастбищ. На сенокосных участках пойменного луга встречаются участки круглой формы с преобладанием болотной растительности – зарастающие озера-блюдца. В прошлом они использовались скотом для водопоя и вытаптывались по берегам, что в значительной мере препятствовало их зарастанию. К настоящему времени, на их месте сформировались луговые гидроморфные почвы. Целью нашей работы было изучение донных отложений действующего озера и гидроморфных почв на территории луговых озер различной степени зарастания. Были изучены донные отложения не зарастающей старицы Дона – озера Горшковое, а также озера Мальчик, где растительный покров и торфянистый слой не успели сформироваться после катастрофического высыхания. На территории озер Безымянное и Кругленькое, где преобладали чередя трехраздельная и осока болотная, образовался слой торфа мощностью до 10 см. Здесь были изучены гидроморфные почвы с выраженным гумусово-железистым горизонтом. В образцах почв и озерных отложений, отобранных из горизонтов на глубине до 40 см, определялась численность олиготрофных и сапротрофных микроорганизмов.

На дне действующего озера Горшковое обилие микроорганизмов снижалось в середине профиля, где грунт был представлен промытым песком, по сравнению с верхним и нижним слоями, обогащенными илом. Почвы исчезнувших озер состояли из органогенного, гумусово-железистого и минерального (без признаков оглеения) горизонтов. На дне высохшего озера Мальчик наблюдалась повышенная численность олиготрофных микроорганизмов, особенно – в железистом горизонте. По мере окончательного высыхания заросших озер, значения численности обеих групп сближались. Особенно высокая численность сапротрофных микроорганизмов была отмечена в верхнем слое торфянистого горизонта на месте озера Безымянное.

Поскольку на исследуемой территории продолжают регулярно сенокосы, зарастание луга древесной растительностью не происходит. В дальнейшем, на территории зарастающих озер ожидается смена влаголюбивых болотных растений (череды и осоки) луговым разнотравьем.

ОЦЕНКА КЛЮЧЕВЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БАЙКАЛЬСКИХ ГЛУБОКОВОДНЫХ АМФИПОД ПРИ ГРАДИЕНТНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ

Широкова Ю.А.¹, Мадьярова Е.В.¹, Мутин А.Д.¹, Шатилина Ж.М.^{1,2}, Тимофеев М.А.^{1,2}

¹НИИ биологии «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

²Байкальский исследовательский центр, Иркутск, Россия

yuliashirokova2501@gmail.com

В связи с тем, что в диапазон глубин обитания амфипод *Ommatogammarus flavus* (Dyb., 1874) (2,5-1300 м) входит верхняя литораль с выраженными изменениями температуры среды, обитающие на больших глубинах амфиподы *O. albinus* (Dyb., 1874) (50-1640 м) могут быть менее устойчивыми к гипертермии, чем *O. flavus*. Целью исследования было оценить реакцию ключевых биохимических показателей на градиентную гипертермию у байкальских глубоководных амфипод.

Амфипод отлавливали с глубин 100-300 м и акклиматизировали в течение 7 сут. при 4°C. В ходе экспериментальной экспозиции амфипод проводили постепенное (1°C/ч) повышение температуры среды от 4°C. Амфипод фиксировали в жидком азоте при достижении следующих температур: 4 (контроль), 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 и 22°C.

Статистически значимое повышение содержания глюкозы в сравнении с контрольной группой наблюдали у *O. flavus* и *O. albinus* при достижении 14 и 16°C соответственно, содержание глюкозы оставалось выше уровней контроля до конца экспозиции. Содержание гликогена статистически значимо снижалось только у *O. flavus* при достижении 16°C и оставалось пониженным до конца экспозиции. Статистически значимые изменения содержания аденилатов и активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) отмечены только у *O. albinus*. Так, при повышении температуры до 18°C у них увеличивалось содержание АТФ, а содержание АДФ и АМФ снижалось при достижении 20 и 12°C соответственно. Также у данного вида увеличивался уровень энергии аденилатов при температуре 12 и 18°C. Активность ЛДГ снижалась при повышении температуры до 10 и 16°C.

У глубоководных амфипод при гипертермии не было выявлено статистически значимых изменений активности каталазы и пероксидазы. У *O. albinus* активность глутатион S-трансферазы статистически значимо повышалась при достижении 10, 16 и 18°C.

Таким образом, при повышении температуры среды у *O. albinus* наблюдали большее количество изменений биохимических параметров, чем у *O. flavus*. Однако оба глубоководных вида обладают определенной устойчивостью к градиентной гипертермии.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки РФ: проект Госзадание FZZE-2020-0026.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЧИСЛЕННОСТИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИЙ ТОРФА ВЕРХОВЫХ БОЛОТ

Шпанов Д.А., Зубов И.Н.

ФИЦ комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова уральского
отделения РАН, Архангельск, Россия

shpanov.d@yandex.ru

Классически, для определения общей численности микроорганизмов (ОЧМ) применяется люминесцентная микроскопия на стекле или мембранных фильтрах. Несмотря на простоту и относительную дешевизну, у данных методов есть существенные проблемы, заключающиеся в длительности, сложности применения двойного окрашивания, субъективности получаемых данных и риске для здоровья при длительной работе. Оптимизировать анализ может проточная цитометрия – высокопроизводительный метод, позволяющий комплексно анализировать популяции клеток.

При цитометрическом анализе, особое значение представляет диспергирование анализируемых клеток в жидкости. В торфе большая часть микроорганизмов закреплена на нерастворимых органических и неорганических носителях, что делает необходимым проведение дополнительных этапов пробоподготовки для отделения клеток. Несмотря на обилие методов, многие протоколы разрабатывались для иных объектов, и требуют оценки применимости и оптимизации.

Было проведено сравнение методов пробоподготовки с окрашиванием распространёнными флюорохромами применяемыми для оценки ОЧМ и физиологического состояния микроорганизмов. Исследовались пробы торфа верхового болота, отобранные с горизонтов 0-50; 90-100 см.

Цитометрический анализ проб, проведённый после обработки ультразвуком (УЗ) (30 мин) и Triton X-100 (0,1 %), показал высокое количество отделённых микробных клеток. Данный метод оказался наиболее эффективным при окраске PI ($2,43 \pm 0,12 - 4,35 \pm 0,22$) * 10^7 , DAPI ($2,53 \pm 0,13 - 4,72 \pm 0,24$) * 10^7 и акридиновым оранжевым ($2,71 \pm 0,14 - 5,76 \pm 0,29$) * 10^7 . Определение жизнеспособных бактерий затруднительно из-за лизиса. Экстракция с метанолом (10%) и УЗ (15 мин) показала уменьшение численности (на 30 %). С SYBR Green I обнаруживается одинаковое количество клеток для обоих методов ($2,53 \pm 0,13 - 4,81 \pm 0,24$) * 10^7 . Выделение комбинированным методом с плавиковой кислотой и УЗ (5 мин) показывает наименьшие результаты (~10 % от Triton X-100).

В результате работы установлено, что наиболее универсальным методом для определения ОЧМ оказалась окраска проб DAPI или SYBR Green I с обработкой УЗ (30 мин) и Triton X-100 после 3-ёх промывок, детектирующим до 95 ± 2 % от кумулятивной численности. Обработка метанолом (10 %) и УЗ (15 мин) позволяет определять жизнеспособные клетки при их достаточном выделении из частиц (75 ± 3 %).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках ФНИР № 122011400386-6.

НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В НАДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ

Щербёнок С.В., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

sshcherbenok@bk.ru

На территории Пермского края засоление почв имеет техногенный характер. Это связано с активной разработкой Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей, отходы которого ежегодно складываются на поверхности в солеотвалы и шламохранилища, тем самым только увеличивая масштабы загрязнения. Солеотвалы и шламохранилища формируют техногенные стоки, что приводит к дальнейшему загрязнению поверхностных, подземных вод и почв в пределах зоны их влияния. Засоление этих территорий сопровождается различным уровнем рН, от резкокислой до щелочной реакции среды.

В условиях засоления нарушается осмотический баланс клетки, что негативно сказывается на водном режиме растений. Засоляющие ионы в почве оказывают токсическое действие на физиологические и биохимические процессы в растительном организме. Адаптация растений к действию негативных факторов среды включает накопление в цитоплазме некоторых органических соединений с низкой молекулярной массой, в частности флавоноидов. Таким образом, изучение механизмов адаптаций, в том числе антиоксидантных свойств растений к условиям засоления, является актуальным.

Целью нашего исследования являлось определение содержания флавоноидов в растениях в условиях техногенного засоления.

В качестве объектов исследований были взяты 6 видов растений около г. Березники в долине реки Лёнвы на вторично засоленной аллювиальной почве с изреженной растительностью: марь белая (*Chenopodium album* L.), бескильница расставленная (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), очиток пурпуровый (*Sedum purpureum* (L.) Shult), торичник солончаковый (*Spergularia salina* J.), лебеда раскидистая (*Atriplex patula* L.), ситник сплюснутый (*Juncus compressus* J.). Для каждого вида пробы листьев собирали в пяти местах произрастания. Количество флавоноидов определяли методом спектрофотометрии.

Высоким содержанием флавоноидов в надземных органах отличились лебеда (0,396%) и ситник (0,334%). У других растений этот показатель варьировал в пределах 0,126% – 0,200 %.

Флавоноиды выполняют функцию регуляторов окислительно-восстановительных процессов, угнетают процессы перекисного окисления макромолекул и другие свободно радикальные реакции, а также защищают растения от стресса различной этимологии. Имеются сведения о том, что флавоноиды, содержащиеся в вакуолях, участвуют в нейтрализации пероксида водорода, а цитозольные и пластидные – молекул свободного кислорода и гидроксильного радикала. Антиоксидантная функция флавоноидов также обусловлена их связывающим действием: они снижают подвижность мембранных липидов, тем самым угнетая действие с ними пероксильных радикалов.

Таким образом, повышенное содержание флавоноидов, характерное для лебеды раскидистой и ситника сплюснутого свидетельствует об активном участии этих соединений в адаптации к условиям засоления.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А			
Абаленихина Ю.В.	249, 254	Асякина А.С.	76, 117
Абашина Т.Н.	173, 200	Атрошенко Д.Л.	71
Абдуллин Т.И.	103	Афанасьев В.Н.	234
Абрамичева П.А.	273	Афонин А.А.	280
Абрамова А.А.	274	Ахметов И.И.	23
Абрамова Т.Н.	4	Ахназарова Э.А.	318
Авдошина Д.В.	94, 115	Ашихмин А.А.	281, 300
Автушенко И.А.	275, 308		
Агладзе К.И.	77	Б	
Аитова А.А.	77	Бабичева Н.А.	285
Акатова Е.В.	163	Багаева Д.И.	131
Акберова Н.И.	44	Багаева Д.Ф.	5
Аксенов Р.Г.	128	Багров Д.В.	52
Алеев В.С.	129	Базлов С.Б.	76
Александрова К.В.	75	Баишникова И.В.	220
Алексеев А.О.	327	Байазыт К.-Д.К.	144
Алехин В.А.	5	Байдамшина Д.Р.	132
Алиева А.Х.	58	Бакуменко С.С.	77
Алиева И.Б.	118	Балакина А.А.	204
Алимова А.А.	276	Балашов Н.В.	282, 286
Алипов В.В.	218	Балезина О.П.	269
Алкалаева Е.З.	12, 73	Балханов Ю.С.	87
Аmineва Е.Ю.	277	Балясин М.В.	88
Амозова В.И.	204	Баранчиков П.А.	311
Андреева-Ковалевская Ж.И.	16, 47	Басина В.П.	78, 99
Аникина Е.А.	310	Басович Л.С.	10
Анисимова О.К.	6, 9	Батаева Ю.В.	310
Антипова В.Н.	29	Баттулин Н.Р.	30
Антоненко А.К.	205	Баукова А.С.	133
Антонова О.Ю.	79, 124	Башкирова И.Г.	134
Апанасевич М.В.	130	Баюрова Е.О.	94
Аракелян А.Г.	7	Бегматов Ш.А.	135
Арзуманова А.Р.	8, 15, 40, 56	Безматерных К.В.	188
Арсениев А.Н.	51	Бекенкали А.Б.	11, 25
Арсенюк А.Ю.	180	Белецкий А.В.	135
Артемова В.С.	206	Беликова Л.Д.	118
Артемюк А.М.	278	Беликова-Исагулянц М.Г.	115
Артыкбаева Г.М.	207	Белов А.А.	176
Артюх Р.И.	29	Белова В.В.	311
Артюхов В.Г.	123	Белова Е.М.	244
Архестова Д.Х.	9	Беломестнов К.А.	26
Аршинцева Е.В.	237	Белоусов В.В.	125
Асраров М.И.	222, 223	Белусь С.К.	90, 92
Астахина С.О.	279	Бельтюкова А.В.	235, 264
		Беляев Г.П.	208

Бендикис А.С.	281	Буян А.И.	14
Бердасова К.С.	283	Быков В.В.	136, 192
Березина Е.В.	291	Быков М.А.	258
Берсенева А.А.	79	Быстрова М.Ф.	36
Бертова А.Д.	284		
Бессонова В.А.	312	В	
Бизяев Н.С.	12	Вайнштейн М.Б.	200
Бикташева М.О.	284	Валеева Е.В.	210
Бирюков М.М.	13	Валеева Л.Р.	290
Блохина М.Л.	232	Валиева В.А.	287
Бобровский Д.М.	177, 195	Ванюшенкова А.А.	176
Бобылёв А.Г.	262	Вартпатрикова Н.А.	177
Бобылёва Л.Г.	262	Васильев А.В.	78, 98, 99, 180
Богачева П.О.	247, 269	Васильев А.О.	211, 256
Богдан В.И.	159	Васильева А.А.	51
Богданов И.И.	187	Васильева Т.И.	267
Богданова Е.М.	284	Васильченко А.С.	147, 186
Боголюбов Д.С.	91	Васягин Е.А.	137
Богомазова А.Н.	118	Ведунова М.В.	106, 257
Богун А.Г.	198	Ведяйкин А.Д.	143, 182
Болдаевский И.С.	136, 192	Веланский П.В.	305
Болихова А.К.	14	Веревкин А.А.	76
Большаков М.А.	281	Вершинина Д.Д.	138
Бонарцев А.П.	89	Веселовский А.В.	74
Бондарев С.А.	27	Ветошкина Д.В.	282, 302
Бондаренко Д.А.	237	Ветрова А.А.	133, 138, 198
Бонч-Осмоловская Е.А.	193	Ветрова О.С.	16, 47
Борисова-Мубаракшина М.М.	282, 286, 300	Ветровой О.В.	212, 248
Бородин А.С.	285	Видягина Е.О.	303
Бороздина Н.А.	209	Вильянен Д.В.	297, 300
Бочарников А.Д.	273	Виноградов М.К.	142
Бочаров Э.В.	17	Виноградова И.А.	239
Бочкова М.С.	121	Винокурова А.С.	139, 145
Бражникова А.В.	286	Виссарионова А.В.	23
Брегадзе В.И.	93	Вихлянцев И.М.	262
Брилкина А.А.	291	Вишняков А.Э.	142
Брылева Е.А.	79	Владимирова С.А.	102
Брысякин Е.Р.	79	Владимирская О.С.	180
Бузанов Г.А.	90, 92	Власенко Л.В.	140
Булаев А.Г.	326	Власенкова Р.А.	43, 48
Булатенко Н.В.	96	Власов И.Н.	33, 58
Булатов Э.Р.	101	Власова А.Д.	5
Бунеева Е.А.	8, 15, 40, 56	Воденеев В.А.	296
Буренина О.Ю.	69	Воинова В.В.	89
Бут С.Ю.	148	Войцеховский И.В.	67
Бутова К.А.	238	Вологжанникова А.А.	136, 192
Бутуханова М.Н.	87	Володина Д.Е.	213
Бухалович С.М.	5	Воробьёв И.И.	199
Бухарова Т.Б.	78, 96, 98, 99		

Дзизюрова В.Д.	318, 334	Журавлева Е.А.	201
Дигрис А.В.	59	Журина М.В.	172
Дилбарян Д.С.	147		
Димитрова А.О.	87	З	
Динкина Е.А.	215	Задорина И.И.	219
Диоманде М.Х.Ж.	320	Зайцева И.А.	220
Довбыш О.В.	80	Закревский Д.Э.	13
Долгих В.В.	37	Заморина С.А.	121
Долодоев А.С.	87	Замуруева В.В.	318, 334
Доманская О.В.	147	Замятина А.В.	16, 47
Донцова О.А.	14, 42	Запорожская-Абрамова Е.С.	111
Дорофеев Н.А.	21	Запорожченко Н.С.	195
Дрёмин В.В.	217	Захарова Н.М.	234
Дроздова П.Б.	321	Захарова О.В.	311
Дубровин С.В.	22, 256	Зацаринная Е.А.	149
Дувалов Е.И.	59	Заюлина К.С.	184, 193
Дудов С.В.	318	Зверева М.Э.	69
Дымова Е.А.	216	Звонарев А.Н.	180
Дэви Н.М.	312	Зельцер А.И.	89
		Злобин Н.Е.	64
Е		Змиевская Е.А.	101
Евдокимов П.В.	81	Зобов В.В.	208
Егорова С.В.	148	Золотовская Е.Д.	321
Егорова Э.С.	23	Зубков А.В.	21
Елизова К.Д.	24	Зубов А.С.	242
Елкина Д.А.	69	Зубов И.Н.	344
Ельченинов А.Г.	184, 193	Зубова К.В.	160
Емельянова Н.В.	232	Зудилова А.А.	27
Емельянова С.С.	18, 110	Зухайб М.	103
Ератова Л.В.	217	Зыкина Н.С.	246
Ерилина Д.А.	229	Зюркалова Д.В.	28
Еркинкажина Е.Е.	11, 25		
Ерохина П.Д.	126	И	
Ефимов Б.А.	180	Ибрагимов А.Э.	293
Ефимова Е.С.	218	Иванов П.А.	159
Ефремова А.С.	96	Иванова А.И.	92, 135
		Иванова Е.В.	150
Ж		Иванова Т.В.	90
Жаркова Е.К.	26	Иванова Т.Д.	47
Жаркова И.И.	89	Иванова Ю.С.	85
Жекайте Е.К.	96	Ивин Ю.Ю.	95, 166
Женило С.В.	41	Ивлев А.П.	263
Жиляева Т.В.	221	Ивлева И.С.	228
Жукова Е.С.	221	Ильин Н.В.	296
Жукова Ю.С.	65	Ильина А.В.	91
Журавлёва А.И.	336	Ильинский Н.С.	5
Журавлева Г.А.	27	Илюха В.В.	246
Журавлева Д.Э.	152	Илюхина А.А.	29

Иминова Л.Р.	151	Коваленко Н.П.	36
Иркаева А.М.	221	Ковалицкая Ю.А.	36
Исамухамедова Д.Р.	222, 223	Коваль О.А.	13
Исмаилова А.А.	291	Коваль О.Е.	292
Исхакова З.И.	152	Ковальчук А.И.	34
		Кожевникова О.С.	272
		Кожухова Е.И.	90
		Козлов А.В.	255
		Козлова А.А.	117
		Козулева М.А.	297, 300
		Кокаева З.Г.	72
		Кокина А.В.	156
		Кокорева Н.Е.	102
		Колесников Д.О.	241
		Колесников С.С.	60, 225
		Колесникова А.И.	191
		Колосова Н.Г.	205
		Колтаков И.А.	123
		Кольжецов Н.П.	55
		Коляденко И.А.	62
		Коляко Ю.В.	94
		Комарова Е.Ю.	18, 110
		Комарова Л.Н.	79, 279, 280
		Комлев В.С.	113
		Кондратенко О.В.	160
		Кондратьева Е.И.	96
		Кондрашова А.С.	94
		Коневега А.Л.	18
		Конина Д.О.	35
		Коняхин Е.А.	126
		Копецкий И.С.	180
		Копылова Е.Е.	36, 225
		Копылова О.А.	157
		Корнеева О.С.	8, 15, 40, 56
		Корнейкова М.В.	337, 340
		Корсакова Е.С.	162
		Костина Д.А.	83, 104
		Костюшев Д.С.	94
		Костюшева А.П.	94
		Косякова А.И.	324
		Косякова Н.И.	105
		Котова П.Д.	216
		Коханенко А.А.	130
		Кохликян Е.О.	95
		Кочаровская Ю.Н.	157, 158
		Кочеткова О.Ю.	79, 124
		Кочкина Е.Н.	225
		Кошель Е.И.	31
		Кравцов Д.В.	139, 145
К			
Кабанова Н.В.	36		
Каберник Н.С.	92		
Кабирова Э.М.	30		
Казначеева Е.В.	241		
Калашникова Т.В.	153		
Калёнов С.В.	161, 176		
Калинин П.И.	327		
Калинина А.Е.	31		
Калинина К.А.	322		
Кальясова Е.А.	296		
Камалов М.И.	103		
Кандинов И.Д.	139, 145		
Канев И.Л.	79		
Каневский М.В.	160		
Капрельянц А.С.	131, 202		
Карасева А.И.	193		
Карасева О.С.	154		
Карасева Э.В.	196		
Каратовская А.П.	16, 47		
Карелкин В.В.	83, 104		
Каримова Е.В.	134		
Карлов В.Д.	64, 70		
Карпенко М.Н.	206, 261		
Касьмова Ж.Е.	11, 25		
Катраева И.В.	201		
Каширская Н.Н.	314, 315, 317, 322, 325, 331, 342		
Каширская Т.П.	314, 315, 317, 322, 325, 331, 342		
Каюмов А.Р.	132, 152, 154, 191, 219		
Кириленко К.М.	130		
Киссер М-С.М.	32		
Киташова М.И.	224		
Киямова Р.Г.	48		
Класс А.Л.	33		
Клементьев С.В.	155		
Клименко М.А.	93		
Климова А.С.	323		
Клишин А.А.	73		
Клюкина А.А.	184		
Кобелев А.В.	155		

Новикова В.О.	240	Позднякова-Филатова И.Ю.	4, 53, 133, 150, 157
Новосельцева Д.П.	285	Покидова О.В.	240
Номеровская М.А.	241	Поливанова О.Б.	288
Носков А.Е.	173	Поливцева В.Н.	151, 173
Носкова Г.П.	87	Полиданов М.А.	218
Носов Г.А.	125	Полякова Л.В.	221
Нургалиев И.М.	31	Полякова Т.В.	236, 246
Нуриева Н.И.	330	Попандопуло К.И.	76
О			
Обухова Д.А.	242	Попов А.Л.	108
Озолинь О.Н.	55	Попов В.Н.	213, 227, 276
Октябрьский О.Н.	153, 188, 190, 194	Попова А.С.	214
Онвумере М.К.	243	Попова И.Ю.	61, 226
Орлова Н.А.	199, 200	Попович С.А.	8, 15, 40, 56
Осипов А.А.	61	Потапова Д.А.	247
Охезин Е.В.	174	Потапова С.С.	248
П			
Павлова Е.Р.	52	Потысьева А.С.	51
Павлова О.А.	332	Правдивцева Е.С.	247
Павловский Ф.Н.	244	Приходченко Т.Р.	204
Панова Э.В.	246	Пролович Е.О.	177
Панферов Е.В.	50	Прохоренко И.Р.	105
Партевян С.А.	58	Прохоров Д.А.	7, 171
Парфенов А.А.	208	Прохорова А.П.	178
Паско В.И.	118	Прусаков К.А.	52
Патракова Е.А.	13	Пуговкина Н.А.	85
Пашковский П.П.	274	Пусенкова Л.И.	287, 332
Переплетчикова Д.А.	104	Путевич Е.Д.	110
Перчиков Р.Н.	333	Путляев В.И.	81
Пестерева Н.С.	206, 260	Пушкин С.Ю.	237
Петренко Т.Я.	318, 334	Пушкина К.В.	237
Петриков К.В.	53	Пушкина Н.И.	179
Петров А.В.	126	Пыхова Е.С.	300
Петров Я.С.	44	Пьянкова А.А.	129
Петрова Т.Е.	28	Пьянова А.С.	292, 301
Петропавловская Е.А.	252	Пятибратов М.Г.	68
Петросян А.А.	335	Пятойкина А.С.	221
Пивоварова Н.С.	86	Р	
Пиняева А.Н.	166	Рабданова Н.П.	87
Пиняскина Е.В.	289	Равин Н.В.	135
Плетнева С.К.	175	Радзюкевич Я.В.	105
Плотников Е.Ю.	273	Райхман Е.В.	79
Плотникова Е.Г.	129, 178	Рахимов Р.Н.	222, 223
Побережный Д.Ю.	176	Редькин Т.С.	106, 257
Поддубная Н.Я.	303	Режепова А.А.	53
		Речкина В.И.	180
		Решетников Д.С.	241
		Ржевский С.Г.	54

Римская Б.А.	77	Седых С.Е.	243
Рогачев В.В.	107	Сеидкулиева А.А.	126, 249, 254
Рогачевская О.А.	268	Селиванова Е.В.	303
Роденко Н.А.	267	Селькова П.А.	51
Родичева М.А.	181	Семенов В.Э.	208
Розова О.Н.	45	Семенова В.В.	252
Рокунов Е.Д.	126, 249, 254	Семенова Е.И.	58
Романов М.В.	108	Семенова Е.М.	165
Ромодин Л.А.	251	Семенова С.А.	86
Росинская А.В.	58	Семенович Д.С.	273
Руденко Н.В.	16, 47	Семина И.И.	210
Рудина Ю.В.	55	Серафимович А.С.	59
Рудько О.И.	72	Сергиев П.В.	14, 42
Рукк Н.С.	90, 92	Сердобинцев П.Ю.	51
Румянцева Н.А.	143, 182	Середин Т.М.	304
Рыбин Д.А.	291	Серова О.В.	17
Рыбкин А.Ю.	255	Серых М.Ф.	87
Рыболовлев И.Н.	58	Сиваев И.Б.	93
Рыжих Ю.С.	302	Сидорова А.Е.	52
Рыжкова А.С.	30	Сизов Л.Р.	255
Рябова А.С.	8, 15, 40, 56	Сизова И.А.	110
		Симонова Р.А.	238
		Сингина Г.Н.	116
		Синицына Ю.В.	296
		Синюгина А.А.	95, 166
		Сиунов А.В.	16, 47
		Скакун В.В.	59
		Складнев Д.А.	176
		Скоблов М.Ю.	35
		Скороход С.Н.	256
		Сладков К.Д.	60
		Слепцова Е.Е.	106, 257
		Сломинский П.А.	33, 58
		Смирнихина С.А.	88
		Смирнова Г.В.	153, 188, 190, 194
		Смирнова Д.В.	83
		Смирнова Е.О.	141
		Согомонян К.С.	142
		Сокол М.Б.	93
		Соколов А.С.	136, 192
		Соколов В.В.	36
		Солонин А.С.	16, 47
		Солоп Е.А.	185
		Сошина А.С.	337
		Спицына А.С.	110
		Степанов А.А.	186
		Степанов С.В.	61, 236
		Стойнова Н.В.	164
		Столярская М.Я.	62
С			
Саатов Т.С.	207		
Савельева П.Д.	31		
Савинова О.С.	183		
Савицкий А.П.	131		
Савченко Т.В.	294		
Савюк М.О.	106, 257		
Садриев К.А.	109		
Сазонова О.И.	138		
Салагаев Г.И.	33		
Саликова Д.А.	252		
Салова В.Д.	184		
Салькин В.В.	237		
Самойлова З.Ю.	175		
Самусева П.Д.	57		
Самылина О.С.	324		
Санина Н.А.	240		
Сапронов Д.В.	336		
Сапронов Н.Д.	336		
Саранчина А.Е.	321		
Сасов Д.А.	21		
Сафарова Д.Н.	265		
Саченков О.А.	219		
Северюхина М.С.	252		
Севостьянов С.М.	158		
Седов А.С.	244		

Страндстрем Е.Б.	180	Трактиров Д.С.	231, 260
Стратиллов В.А.	212, 265	Трефилов В.С.	69
Стрелков М.С.	258	Триандафилова Г.А.	190
Струева П.А.	63	Тризна Е.Ю.	191
Ступина Т.С.	204	Трифопова В.А.	338
Суворова И.И.	75	Трунилина М.В.	136, 192
Сузина Н.Е.	173	Трушин В.О.	193
Сильдина Е.В.	187	Турубанова В.Д.	106, 257
Супрун И.В.	111	Тутукина М.Н.	38, 177, 195, 258
Сурменев Р.А.	89	Тучина Е.С.	218
Сурменова М.А.	89	Тындык М.Л.	232
Сутормина Л.В.	188	Тюленев А.В.	194
Сущенко А.С.	64	Тюрин В. И.	122
Сыровацкая Г.А.	189	Тютюнник Т.В.	242, 261
Сюткин А.С.	68		
Т		У	
Такки О.Д.	50, 65	Ужвиюк С.В.	121
Таранов В.В.	49, 70	Урюпина Т.А.	262
Тарасенко Т.А.	24	Усатых А.А.	263
Тарасов А.С.	259	Успенко Н.И.	236
Тарасова Е.К.	112	Ф	
Тарасова Е.О.	269	Федорова М.О.	195
Тахмезов А.Э.	218	Федорова Т.В.	183
Творогова В.Е.	278	Федорос Е.И.	232
Телегина Д.В.	205	Федотова А.В.	310
Телицин В.Д.	181	Федулина А.А.	235, 264
Теплова П.О.	234	Феоктистова Н.А.	187
Терентьев В.В.	302	Фетисов А.И.	258
Тетерина А.Ю.	113	Фетисова В.Э.	113
Тимганова В.П.	121	Филатова А.Ю.	35
Тимофеев М.А.	321, 343	Филатова Е.В.	33
Тимофеев С.А.	37	Филатова Н.В.	255
Тимофеева А.М.	243	Филиппов Я.Ю.	100
Тимофеева К.Н.	26	Филюшин М.А.	6
Тимченко М.А.	262	Фоменко А.А.	196
Тихомирова Т.С.	66	Фомичева А.А.	265
Тихонов К.Г.	294	Французова Е.Э.	133, 198
Тихонова П.С.	161	Фролов Е.М.	114, 259
Тойшиманов М.Р.	67	Фролова Г.А.	115
Токтохоева Л.Н.	87	Фурсова А.Ж.	272
Толкачева А.А.	8, 15, 40, 56		
Толмачева А.С.	243	Х	
Толстыко Е.А.	110	Хабарова А.А.	30
Томский А.А.	244	Хабибулина В.Р.	142
Топилина М.Ю.	68	Харахинов А.Ю.	87
Топоркова Я.Ю.	141	Харечкина Е.С.	266
Төлеуқанова Т.Т.	11, 25		

	Э		Якупова А.И.	275, 308
Эргашев Н.А.		222, 223	Якупова Э.И.	273
			Якушева Е.Н.	249
			Ялалова И.Р.	207
	Ю		Яруллина Д.Р.	154
Юнусова А.К.		29	Ястребова О.В.	178
Юрков А.П.		34	Ястремский Е.В.	110
Юрова М.Н.		232	Яхиа М. Наит	154
	Я		Ж	
Яббаров Н.Г.		93	Лiao Y.	278

Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук
Институт белка Российской академии наук

Научное издание

Сборник тезисов

26-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых
с международным участием

«БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 05.04.2023. Формат 60x84/8
Усл. печ. л. 41,35

ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023



Федеральный исследовательский центр
**ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**
Российской Академии наук



ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОФИЗИКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



ИНСТИТУТ БЕЛКА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Спонсоры и партнеры



ПРИ ПОДДЕРЖКЕ
ФОНДА
ПРЕЗИДЕНТСКИХ
ГРАНТОВ



БИРЮЧ
ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР



BIOSAN Biolabmix®
ГРУППА КОМПАНИЙ



BioinnLabs



Okabiolab
ВСЁ ДЛЯ НАУКИ



НАНОЛЕК



ФОСАГРО®



Лаборатория
ЗНАНИЙ