

ЛОМОНОСОВ 2016
Секция Биология



*Международная
научная конференция
студентов, аспирантов
и молодых ученых*

ЛОМОНОСОВ – 2016

Секция «БИОЛОГИЯ»

11-15 апреля 2016 г.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Москва
2016

УДК 57

ББК 28

Составители сборника и оргкомитет секции «Биология»:

Темерева Е.Н. (*председатель*), **Ворцепнева Е.В.** (*ответственный секретарь*), **Азовский А.И.** (*гидробиология и общая экология*), **Байжуманов А.А.** (*биофизика и бионанотехнологии*), **Еланская И.В.** (*генетика*), **Квартальнов П.В.** (*зоология позвоночных*), **Комарова А.В.** (*биофизика и бионанотехнологии*), **Корнеева В.А.** (*микробиология*), **Кошелева Н.В.** (*биология развития*), **Кудрявцева О.А.** (*микология и альгология*), **Левицкий С.А.** (*молекулярная биология*), **Липина Т.В.** (*клеточная биология и гистология*), **Литвинова А.С.** (*нейрофизиология и физиология высшей нервной деятельности*), **Ловать М.Л.** (*физиология человека и животных*), **Никитин Н.А.** (*вирусология*), **Новоселецкий В.Н.** (*биоинженерия*), **Ремизова М.В.** (*ботаника*), **Римская-Корсакова Н.Н.** (*зоология беспозвоночных*), **Синёва И.М.** (*антропология*), **Случанко Н.Н.** (*биохимия*), **Стриж И.Г.** (*физиология растений*), **Федосов В.Э.** (*экология растений*), **Фридман В.С.** (*охрана окружающей среды*).

Ломоносов – 2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология»; 11-15 апреля 2016 г.: Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Тезисы докладов. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – 416 с.

Оргкомитет конференции благодарит руководство Биологического факультета МГУ за помощь в проведении конференции

ISBN 978-5-9908165-6-5

©Биологический факультет
МГУ имени М.В.Ломоносова, 2016

Оглавление

АНТРОПОЛОГИЯ	3
БИОИНЖЕНЕРИЯ.....	15
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ.....	29
БИОФИЗИКА И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ.....	56
БИОХИМИЯ.....	77
БОТАНИКА	93
ВИРУСОЛОГИЯ	106
ГЕНЕТИКА.....	115
ГИДРОБИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ЭКОЛОГИЯ.....	145
ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ	161
ЗООЛОГИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ.....	176
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГИСТОЛОГИЯ.....	197
МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ	214
МИКРОБИОЛОГИЯ.....	246
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ	271
НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ.....	304
ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	322
ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ	343
ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.....	369
ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ.....	410

АНТРОПОЛОГИЯ

Разработка типологии лица с помощью метода главных компонент

Веселкова Дарья Владимировна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,

кафедра антропологии, Россия, Москва

daria.veselkova@yandex.ru

Формальных схем описания лица человека немного, и в большинстве своем они являются частью конституциональных схем, поэтому типы лица выделяются в соответствии с типами телосложения, а не по собственно характеристикам лица. Между тем показано, что степень корреляции признаков лица и тела невысока, а значит, варианты типов лица слабо связаны с вариантами типов конституций. Кроме того существующие схемы дискретны и описывают далеко не всю наблюдаемую изменчивость. Объективно учесть существующие закономерности изменчивости и отразить непрерывность вариации признаков лица позволяет подход к построению непрерывных конституциональных схем, сформулированный В.Е. Дерябиным.

Материалом для исследования послужили паспортные и антропологические фото анфас – всего 680 индивидов. Измерения производились в программе «Барс Поиск» по габитоскопической методике измерений и включали 8 параметров лица. Статистическая обработка данных и построение типологии с помощью метода главных компонент выполнены в программе «STATISTICA 8».

По результатам корреляционного анализа выделились две группы размеров, связи внутри которых выше, чем между этими группами. Однако даже внутри групп уровень корреляции признаков средний или низкий.

Первая главная компонента учитывает тотальные размеры лица, вторая – высотно-широтные пропорции лица, третья – соотношение размеров рта и носа, т.е. центральную часть лица. Суммарно первые три компонента описывают около 70% изменчивости. Построенная в координатах второй и третьей главных компонент типологическая схема отражает изменчивость как общей формы лица, так и его центральной части.

Невысокие корреляционные связи между признаками предполагают существование большого количества их сочетаний. Используемый для построения типологии подход позволяет учесть их и объективно описать наблюдаемые закономерности изменчивости. Полученная типология легко формализуется, что позволит объективизировать описание лица человека на основе имеющегося набора признаков.

Сравнение корреляционных матриц, полученных при измерении фотографий, с литературными данными показало: степень связи признаков, измеренных по фотографии, выше, чем измеренных на лице живого человека, и сопоставима со степенью связи признаков лицевого отдела черепа. Это предполагает аналогичные закономерности изменчивости признаков на черепе и возможность сопоставления изображений лица и черепа в рамках разработанной типологии.

Новые данные к краниологической характеристике ранних кочевников Южного Урала

Гильмитдинова Алина Харисовна

Институт археологии РАН, Россия, Москва

melnichuk.alina@mail.ru

Происхождение раннесарматской культуры Южного Урала до сих пор остается одной из наиболее важных проблем в сарматоведении. По мнению ряда исследователей, зарождение раннесарматской культуры происходило в пределах самаро-уральского варианта савроматской культуры. По К.Ф. Смирнову и М.Г. Мошковой раннесарматская культура могла возникнуть в результате слияния и перегруппировки местных и пришлых кочевых племен.

Исследование антропологических особенностей сармат имеет давнюю историю, однако лучше всего изучена морфология их черепа и посткраниального скелета. Дискретно-варьирующие признаки (ДВП) черепа сармат долгое время не привлекали внимания. Анализ ДВП черепа сармат был проведен А.А.Мовсесян, работа которой ориентирована на вопросы происхождения поздних скифов (сарматский материал использован как сравнительный).

Целью работы являлся сравнительный анализ ДВП черепа ранних кочевников Южного Урала савроматского и раннесарматского времени. Изучено 80 черепов из фондов НИИМА МГУ. Выборка вт.пол. VI–Vвв. до н.э. (n=39) происходит из могильников Аландское, Близнецы, Новый Кумак, Пятимары I, Тара-Бутак, Увак, Барышниково, Мечет-Сай. Выборка IV–IIIвв. до н.э. (n=41) – из могильников Близнецы, Буруктал, Герасимовка II, III, Любимово, Мечет-Сай, Увак, Пятимары I.

Программа исследования включала 35 ДВП, часть из которых традиционна для отечественной палеофенетики, а часть является новыми (двойной оптический канал, третий решетчатый канал по Томашевич, Везалиево отверстие, разомкнутое овальное отверстие, остатки каменисто-чешуйчатого шва, заднескуловой шов по Козинцеву).

Изучение ДВП черепа ранних кочевников Южного Урала по авторской программе позволило выделить ряд их краниофенетических особенностей, среди которых можно отметить высокие частоты третьего решетчатого канала, разомкнутых овальных отверстий, Везалиевых отверстий, кандиллярных каналов, *os bregmae*.

Выявлено, что частоты целого ряда ДВП черепа имеют достоверные различия у населения савроматского и раннесарматского периодов (*canalis condylaris*, *canalis hypoglossalis septus*, *foramen parietale*, *os lambdae*, *os postsquamosum*, *foramen mastoideum*, *sutura petrosquamosa* и др.). Эти данные позволяют обоснованно предположить, что представители раннесарматской культуры Южного Урала не являлись прямыми потомками населения, обитавшего здесь в савроматское время.

Взаимосвязь строения лицевого черепа и климатических условий на территории Европы

Евтеев Андрей Алексеевич

НИИ и Музей антропологии МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

evteandr@gmail.com

В качестве модели для изучения адаптивных изменений черепа предков человека в условиях сурового климата ледниковой эпохи зачастую используются группы населения

Сибири и Северо-Восточной Азии. Однако насколько оправдано использование такой модели?

Климат Северо-Восточной Европы, который во многом напоминает условия приледниковой зоны плейстоцена, значительно теплее, но и значительно влажнее климата Сибири. Это значит, что и адаптация в этих климатических зонах может принимать различные формы. Исходное строение лицевого скелета древних европейцев также существенно отличалось от такового у колонизаторов севера Сибири последних тысячелетий.

В данной работе девять популяций из Северо-Восточной Европы сопоставляются с десятью группами, представляющими более теплые регионы континента. Результаты сопоставляются с данными предыдущей работы, где изучались адаптивные изменения лицевого скелета на территории Азии.

Сопоставлялась изменчивость двадцати четырех измерительных признаков с одной стороны, и девяти климатических показателей – с другой. Использовались методы частичных наименьших квадратов (PLS) и тест Мантеля.

Было показано (данные PLS), что ассоциация с климатом объясняет примерно вдвое меньшую часть морфологической изменчивости лицевого черепа в европейских группах (около 10%), чем в азиатских (более 20%). Коэффициент корреляции (тест Мантеля) между матрицами климатических и морфологических дистанций у европейцев также был снижен (0,45 против 0,62 на территории Азии). Существенные изменения формы лицевого черепа наблюдались, в первую очередь, в группах Северо-Восточной Европы: русских, украинцев, латышей, финнов, мордвы, коми, карел.

Среди климатических показателей на обоих континентах наибольшую роль играла температура воздуха, однако уровень осадков и облачность в холодное время года имели существенно большее значение на территории Европы.

Как в Европе, так и в Азии, популяции из более холодных регионов характеризовались некоторым увеличением ширины носа, длины и ширины верхней челюсти, сужением и удлинением носовой полости. Однако жители Северо-Восточной Европы также отличались от своих южных соседей ослабленным выступанием носа и лица в целом, заметным уменьшением высоты грушевидного отверстия, глазниц и носовых костей.

Далее, данные о строении лицевого скелета у верхнепалеолитических европейцев анализируются в контексте полученных результатов.

Работа была проведена при поддержке РФФИ, проект № 16-36-00019 мол_а.

Проблемы содержания обезьян в Сухумском питомнике

Звягина Екатерина Александровна

Российский государственный аграрный университет

МСХА имени К.А.Тимирязева, Россия, Москва

great-katy@yandex.ru

Проблемы содержания обезьян в Сухумском питомнике, состоят в ограничении возможностей и нехватки некоторых средств. Отсутствие надлежащих мест для проведения ветеринарных мероприятий также является актуальной проблемой лечения обезьян и проведения операций. Объектом изучения являются обезьяны, численность которых представлена свыше 500 особей. В ходе изучения данной проблемы были

использованы как методы наблюдения, так и экспериментальные. В ходе наблюдений были выявлены проблемы кормления обезьян, одна из них свидетельствует о плохой усвояемости моркови обезьянами. Большинство подопытных обезьян содержатся в индивидуальных клетках, что препятствует их общению в группе, а также свободе перемещения. Животные, содержащиеся в открытых вольерах, не очень хорошо защищены от холода, ввиду заболеваний обезьян старшего возраста. Также необходимо отметить, что в питомнике отсутствуют специальные помещения для проведения операций, что усложняет работу. Нельзя не отметить и положительные результаты, так в вольерах поддерживается оптимальная чистота и не ограничивается свобода. Приматы в группе общаются между собой. А также имеются все необходимые инструменты, для проведения операций и всегда может быть проведена экстренная помощь животному. Кроме того инструменты хранятся в чистоте.

Из проделанного анализа, качества содержания приматов можно сделать выводы:

- Условия содержания являются подходящими для приматов;
- Соблюдаются поддержание чистоты в вольерах и соблюдаются нормы кормления;
- Неотъемлемой частью ветеринарных мероприятий, является выделение отдельных стерильных помещений для проведения операций;
- Необходимо выделить больше пространства для подопытных обезьян.

Анализ флуктуирующей асимметрии зубов в серии эскимосов

(по материалам могильников Эквен, Наукан и Уэлен)

Карасева Ника Михайловна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,

кафедра антропологии, Россия, Москва

nikaraseva@mail.ru

Флуктуирующая асимметрия зубов, по мнению исследователей, является следствием физиологических стрессов, перенесенных в детстве. Как известно, эскимосы проживают в суровых условиях Крайнего Севера, и наличие стрессовых факторов в их жизни, и в особенности в период роста организма, не может быть поставлено под сомнение.

Были измерены зубы на верхних и нижних челюстях у 217 индивидов из трёх эскимосских серий Эквен, Наукан и Уэлен (из них 105 женщин, 95 мужчин, 13 детей и 4 половозрелых индивида, неопределенных по полу). Измерения вестибулолингвального и мезиодистального диаметров коронок зубов проводились с помощью электронного калипера по методике А.А.Зубова. Оценка флуктуирующей асимметрии – по формуле $F = L - R$, где L – левая сторона тела, а R – правая. В качестве дополнительного индикатора физиологического стресса оценивалось наличие эмалевой гипоплазии на коронках постоянных зубов (патологическое нарушение формирования эмали, связанное с перенесенными в детстве стрессами).

При изучении асимметрии размеров зубов в серии не обнаружено статистически достоверных половых различий. В обобщенной выборке по мезиодистальному диаметру зубов верхней челюсти выявлено, что все зубы правой стороны больше по размеру, то есть наблюдается не флуктуирующая, а направленная асимметрия. На нижней челюсти по этому диаметру выявлена флуктуация размеров коронок первых премоляров и третьих моляров. Остальные зубы демонстрировали направленную асимметрию. По

вестибулолингвальному диаметру на верхней челюсти выявлена флуктуирующая асимметрия первых резцов, клыков и третьих моляров. На нижней челюсти – первых резцов, клыков, вторых премоляров и первых, третьих моляров. При оценке флуктуирующей асимметрии с учетом наличия эмалевой гипоплазии выявлено, что особенно чувствительными зубами в условиях физиологического стресса являются клыки и третьи моляры. Статистически достоверные отличия фиксируются только по вестибулолингвальному диаметру этих классов зубов.

Таким образом, анализ флуктуации размеров зубов на примере эскимосов показал, что существует направленная и флуктуирующая асимметрия, что не противоречит литературным источникам. Наибольшему воздействию стресса в период формирования коронок подвержены зубы нижней челюсти. Вестибулолингвальный диаметр дает более отчетливую дифференциацию, чем мезиодистальный.

Происхождение среднедонского населения скифского времени

Конопелькин Дмитрий Сергеевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

dmitry.konopelkin@gmail.com

Средний Дон – северо-восточная периферия Европейской Скифии. Вопрос о происхождении населения, оставившего в раннем железном веке курганы в этом регионе, до сих пор дискутируется. Многолетние археологические исследования экспедиции Института археологии РАН, в составе которой работала антрополог М.В. Добровольская, позволили сформировать коллекцию палеоантропологических материалов из курганов V–IV вв. до н.э.

Серия из 13 мужских и 26 женских черепов среднедонского региона из пяти курганных могильников раннего железного века измерена по стандартной краниометрической методике. Сопоставление со сравнительным материалом проводилось с помощью метода кластеризации.

По результатам проведенного анализа мужская часть исследуемой выборки отнесена к кластеру, состоящему из двух субкластеров. В первый, кроме неё, входят синхронные группы из курганных захоронений Поднестровья и Восточного Крыма. Во второй – серии предшествовавшей срубной культуры Украины и Нижнего Поволжья. Статистически достоверно отличаются синхронные краниологические серии из курганов Нижнего Подонья, курганов Нижнего Поволжья, грунтовых погребений Восточного Крыма (Фронтное). Женская часть исследуемой выборки не отнесена к какому-либо кластеру. Наиболее близкое положение занимают женские выборки из курганных погребений Нижнего Подонья и Нижнего Поволжья.

Полученные результаты позволяют предполагать, что в сложении мужской части среднедонского «курганного» населения приняли участие выходцы из различных южных степных пределов Европейской Скифии. Своеобразие женской части выборки можно объяснить влиянием групп, возможно расположенных севернее, которые не учтены в работе. В обоих случаях возможность происхождения от носителей, хронологически предшествовавшей, срубной культуры не находит явных подтверждений.

Суточное потребление калорий, физическая активность и показатели обмена у современных девочек (на примере г. Элиста, г. Москва и г. Архангельск)

Пермякова Екатерина Юрьевна

НИИ и Музей антропологии МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

ekaterinapermyakova@gmail.com

Процесс увеличения числа индивидов с избыточной массой тела приобретает в последнее время столь глобальный характер, что многие исследователи говорят о «секулярном ожирении». Особый интерес представляет изучение влияния, которое оказывают на параметры жиросотложения, систематические физические нагрузки, а также суточное потребление калорий.

Настоящая работа посвящена оценке физической активности, суточного потребления калорий, а также показателей физического обмена современных детей и подростков 7-17 лет.

Материалом послужили данные обследований девочек г. Архангельска и г. Москвы, проводившихся в учебных заведениях в 2005 г., 2009–2010 гг.; а также данные по калмычкам г. Элиста (2007 – 2011 гг.). Информация получена посредством анкетирования, а также методами биоимпедансометрии (основной обмен). Общее число обследованных – 382 человека.

Показано, что девочки г. Элиста и г. Москва потребляют достоверно большее, чем их северные сверстницы, количество калорий в сутки, лидирующее положение занимают представительницы первой группы. Что касается активности, то москвички уделяют максимальное количество времени, как физическим нагрузкам, так и работе в условиях гипокинезии (чтение, работа за компьютером), на статистически значимом уровне. Между жительницами г. Архангельск и г. Элиста различия минимальны по показателю физической занятости, а вот по времени, отведенному на пассивный отдых, вторая группа значительно отстает. Также, несмотря на максимальное среди трех групп суточное потребление калорий, калмычки по показателям основного обмена достоверно отстают и от москвичек, и от северных жительниц, что свидетельствует о небольших значениях клеточной массы, вовлеченной в активные метаболические процессы. Максимальные показатели обмена отмечены у жительниц г. Москвы, где, как отмечено, большее количество времени отведено на физические упражнения.

Таким образом, современные жительницы г. Элиста потребляют достоверно большее количество калорий по сравнению с остальными двумя группами. При этом, калмычки достоверно «стройнее» своих сверстниц, что свидетельствует о влиянии на телосложение исторически сложившихся особенностей коренного населения данной области. Жительницы г. Москва, напротив, выходят по данным характеристикам на первое место, что, возможно, является результатом работы в условиях гипокинезии, которая отчасти нивелирует время, затраченное на физические упражнения.

**Группоразграничительные возможности дополнительных дискретно –
варьирующих признаков черепа (по материалам древнерусского времени)**

Сапухина Елена Андреевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

lena.sapuhina@gmail.com

Дискретно-варьирующие признаки (ДВП) черепа – относительно хорошо разработанная система маркеров. В российской антропологии используются две системы ДВП черепа. Однако за их рамками остаются некоторые признаки, известные из анатомической и антропологической литературы. Целью данной работы является изучение ряда таких признаков и выяснение их группоразграничительных возможностей. Для этого выбраны: двойной оптический канал, третий решетчатый канал по Томашевич, резцовые швы, Везалиево отверстие, наружное отверстие канальца улитки, ямка базиллярной части затылочной кости, надсосцевидные ямки по Пежемскому, поворот венозного синуса; в дополнение взяты КВШ и ПГУ-I/II по Козинцеву, частоты по которым рассчитывались «на одного индивида».

Материалами для работы послужили черепа из древнерусских курганов XII–XIII вв. верхних течений Днепра и Волги, хранящиеся в НИИМА МГУ. В задачи исследования входило сравнение тверских и смоленских кривичей по указанному набору ДВП. Всего исследовано 169 черепов кривичей (79 тверских, 90 смоленских). К черепам из раскопок XIX в., добавлены новые материалы из памятников Ржевского Поволжья и двух могильников Смоленской области.

Материалы древнерусского времени исследовались А.А.Мовсесян, которая объединяла их по «летописным племенам» в соответствии с археологической атрибуцией. Сходную работу проделал Г.Чеснис, который рассмотрел их на более локальном уровне. А.А.Мовсесян предполагает, что внутри каждого «племени» проявляется некоторая генетическая общность. По мнению Г.Чесниса все кривичи входят в один кластер классификационной дендрограммы, но смоленские кривичи сильно тяготеют к полоцким, а тверские – к дреговичам.

На первом этапе анализа был рассчитан t-критерий Стьюдента для опубликованных данных по ДВП черепа кривичей. По частотам А.А.Мовсесян между тверскими и смоленскими кривичами выявлены достоверные отличия по *os asterii* и *foramen parietale*. По частотам Г.Чесниса – по *foramen frontale*, *foramen mastoideum*, *arcus pterygospinosus* и также *os asterii*.

Далее были рассчитаны частоты дополнительных ДВП и t-критерий по ним. Достоверные различия (p не менее 0,05) были выявлены по КВШ, третьему решетчатому каналу и наружному отверстию канальца улитки. Таким образом, две рассматриваемые группы достоверно различаются по восьми признакам, что позволяет говорить о разнице их генофондов. Важным результатом является подтверждение дифференцирующих возможностей выбранных для анализа ДВП черепа.

Морфофункциональные особенности студенческой молодежи г. Саранска

Синева Ирина Михайловна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

i-sineva@yandex.ru

Переход к информационному этапу развития цивилизации в последние десятилетия значительно повлиял на уклад жизни современного человечества, в первую очередь населения крупных городов развитых стран. Уменьшение физических нагрузок и гиподинамия, с одной стороны, и усиление влияния информационной и социальной нагрузок, с другой, крайне негативно сказывается на здоровье и состоянии физического развития детей, подростков и молодежи. По этой причине очевидна актуальность проведения систематических медико-биологических мониторингов с целью оценки уровня физического развития и адаптационных возможностей современной молодежи.

Настоящее исследование опирается на материалы комплексного антропологического обследования студентов различных вузов г. Саранска, проведенного осенью 2015 г. Общая численность обследованных составляет 195 человек (86 юношей и 107 девушек) в возрасте от 17 до 23 лет.

Для характеристики уровня физического развития молодежи разных городов проведен статистический анализ основных антропометрических показателей: длина и масса тела, обхваты талии и бедер. Рассчитаны индекс массы тела (ИМТ) и соотношение обхвата талии к обхвату бедер. Для оценки компонентов состава тела применен метод биоимпедансометрии. Также проведена оценка адаптационного потенциала организма по методике Р.М. Баевского.

Анализ антропометрических данных юношей показал, что для студентов, обучающиеся в вузах г. Саранска, характерны средние для российских городов длина и масса тела, а также обхватные размеры корпуса и показатели ИМТ. В сравнении со студентами московских вузов юноши г. Саранска отличаются меньшим значением жировой массы, но большими значениями активной клеточной массы и уровня основного обмена.

Девушки, обучающиеся в вузах г. Саранска, также характеризуются средними по России показателями физического развития, уступая москвичкам по массе тела, ИМТ и показателю жировой массы.

Оценка уровня адаптационного потенциала показывает, что среди обследованных юношей доля индивидов с удовлетворительной адаптацией составляет 36%, с напряжением адаптационных возможностей – 20,9%, с неудовлетворительной адаптацией – 23,3%, срыв адаптации отмечен в 19,8% случаев. Для девушек распределение по градациям адаптационного потенциала следующее: 35,5%, 35,5%, 15,9% и 13,1%, соответственно.

Таким образом, можно заключить, что образ жизни студенческой молодежи г. Саранска отличается сбалансированностью физической и умственной активности. Однако распределение уровней адаптационного потенциала говорит о довольно высоком напряжении адаптационных механизмов в исследованной группе.

Автор выражает благодарность аспирантке кафедры антропологии А.М. Юдиной за предоставление материалов комплексного морфологического обследования студентов вузов г. Саранска.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-06-03511.

Антропологические подходы к изучению когнитивных функций мозга

Талипова Аделия Ериковна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

adelkamj@mail.ru

Исследование взаимосвязей антропологических и психологических особенностей является важным в оценке когнитивных функций мозга. К настоящему времени сложились представления о том, что сложные процессы, идущие в ЦНС, могут быть в той или иной степени генетически детерминированы.

В ходе работы обследовано 164 студента биологического факультета МГУ (94 девушки и 70 юношей) со средним возрастом 21 год. Проводилось антропометрическое обследование; психологическое тестирование по методикам «Прогнозис», Равена и Люшера; молекулярно-генетическое исследование полиморфизма ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ).

Исследование когнитивных процессов с использованием методики «Прогнозис» позволяет дифференцировать контингент испытуемых на 3 группы (1-я - с адекватным формированием прогноза - 67,49%, 2-я – с трудностями прогнозирования – 15,95%, 3-я – не справившиеся с задачей – 16,56%). В группах, различных по уровню эффективности прогностической деятельности, выявлены соматические признаки, обладающие наибольшей диагностической ценностью: высотный диаметр головы, обхваты талии и бедер. При сопоставлении результатов тестирования юношей выявлена взаимосвязь между эффективностью прогностической деятельности («Прогнозис») и уровнем интеллекта (Равен). Влияние уровня тревожности (Люшер) на эффективность прогностической деятельности в данной выборке не выявлено. В соответствии с наличием инсерции/делеции по гену АСЕ формируются 3 генотипа: II – гомозигота по наличию инсерции (14,77%), DD – гомозигота по делеции (31,82%), ID – гетерозигота (53,41%). В зависимости от полиморфизма гена АСЕ выявлены статистически значимые различия по ряду соматических признаков, наиболее значимыми являются показатель массивности костяка и длина туловища, а среди головных размеров – высотный диаметр у юношей, продольный и поперечный диаметры у девушек. Обнаружена ассоциация D-аллеля гена АСЕ со снижением эффективности прогностической деятельности.

Оригинальный комплексный подход к исследованию сложной проблемы взаимосвязей антропологических, психологических и генетических особенностей между различными аспектами в индивидуальности человека составляют основную ценность данного исследования. Впервые выявлена связь полиморфизма гена АСЕ с когнитивными функциями мозга у студенческой молодежи.

Дифференцирующие возможности некоторых метрических признаков

мозгового отдела черепа человека

Федорчук Ольга Алексеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

olga-94_94@mail.ru

Как правило в краниологических исследованиях внимание уделяется лицевому черепу и признакам мозговой капсулы, входящим в стандартную краниометрическую программу. Дополнительные признаки, характеризующие нейрокраниум, пока недостаточно изучены с точки зрения их внутригрупповой и межгрупповой изменчивости.

В задачи работы входила проверка дифференцирующих возможностей 11 признаков стандартного бланка и указатели, рассчитанных на их основе. Также анализировалась изменчивость базило-постериорной ширины черепа, предложенной Ю.Д. Беневоленской, общей ростовой величины, указателей долихоидности, брахиоидности, гипсоидности, предложенных А.П. Пестряковым.

Материалом послужили мужские черепа восьми этно-территориальных выборок: армян (n=103), осетин (n=89) латышей (n=32), хантов (n=97), эскимосов (n=28), измеренные автором в фондах НИИМА МГУ; и данные по ногайцам (n=21), башкирам (n=42), казахам (n=45), взятым из литературы.

Выявлены следующие особенности внутригрупповой и межгрупповой изменчивости анализируемых признаков. Базило-постериорный диаметр связан с шириной основания черепа коэффициентами корреляции разного уровня (0,59–0,79). Разница этих диаметров варьирует от минимальных значений (~0) у монголоидов до 2,9 мм у европеоидов.

Выбранные линейные признаки хорошо дифференцируют монголоидные группы (казахи, башкиры, ханты, эскимосы) от европеоидных (латыши, осетины, армяне), кроме группы смешанного происхождения — ногайцев — занимающей промежуточное положение. Продольный диаметр черепа варьирует относительно независимо от высотных и широтных характеристик. Из последних стоит отметить важное группоразграничительное значение верхней ширины лица, скулового диаметра и ширины основания черепа.

Анализ указателей показал сходный результат. Однако, нами выявлена специфика строения черепа эскимосов: в силу своей высокосводности и относительной широколобости они тяготеют к европеоидам. Монголоидные выборки обладают низким сводом мозговой капсулы и относительно узкой лобной костью. Максимально высокосводны в этой системе признаков черепа армяне, которые также обладают максимальной относительной шириной, близкой к относительной ширине черепов казахов.

Величина посторбитального сужения (отношение верхней ширины лица к наименьшей ширине лобной кости), отличают европейские и азиатские выборки (в азиатских оно значительно больше, максимальное значение у казахов).

В результате проведенного исследования можно заключить, что использование линейных признаков и указателей, в том числе предложенных А.П. Пестряковым, надежно дифференцирует исследуемые этнические группы, основываясь только на параметрах нейрокраниума. Изменчивость отдельных признаков имеет четкую географическую закономерность, а также характеризует некоторые расово-диагностические особенности. Использованные указатели лучше дифференцируют группы чем линейные размеры.

Кожные узоры стоп и функциональная асимметрия ног у мордовских и русских мужчин

Филькин Иван Александрович

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
кафедра антропологии, Россия, Москва
filkiniva@rambler.ru*

Развитие функциональной асимметрии ног в онтогенезе человека слабо изучено: пока нет единого мнения относительно степени наследственной предрасположенности, врождённого или приобретённого характера этого качества. Особый интерес вызывает изучение указанной проблемы в прикладном плане, в частности для спортивной практики.

Данная работа посвящена анализу билатеральной изменчивости папиллярных узоров стоп в связи с функциональной асимметрией ног. Материалом для исследования послужили отпечатки стоп 90 мордовских и 35 русских мужчин из Zubovo-Polyanskogo района Мордовии (в возрасте от 6 до 58 лет). Ведущую ногу у обследованных определяли на основании распределения величин коэффициента функциональной асимметрии, вычисленного по совокупности десяти тестов. Возрастных различий в степени асимметрии не выявлено.

Среди мордовских и русских мужчин значительно преобладает тип с ведущей правой ногой (78-86%), реже других вариантов встречается амбидекстрия (6-9%).

В ходе канонического анализа между выделенными типами обнаружены достоверные различия по комплексам признаков дерматоглифики. В обеих этнических группах особенно ярко эти различия проявились для функционально противоположных вариантов: правоногие и левоногие разделились по первой канонической переменной, описывающей 58-66% общей изменчивости. Амбидекстры обособились от этих когорт по второй канонической переменной (34-42 % вариаций). Для анализа выборок мордвы и русских использовались разные наборы признаков, но в целом у правой ноги выше узорность правой стопы (включая пальцы ног), а у левой – левой. У амбидекстров узоры пальцев сложнее на левой ноге, а узорность подушечек выше на правой.

Различия между вариантами моторной асимметрии ног по билатеральному распределению признаков плантарной дерматоглифики могут свидетельствовать о врожденном характере этих функциональных характеристик.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-06-03511 «Исследование феномена биосоциальной адаптации современной молодежи в условиях информационного общества начала XXI века соматическими, физиологическими и дерматоглифическими методами».

Антропологические аспекты адаптации иностранных студентов к жизни и учебе в России

Шимановская Анна Сергеевна

*МГУ имени Ломоносова, Россия, Москва
saymyru@mail.ru*

Процессы адаптации студентов к жизни и учёбе в другой стране привлекают сегодня внимание многих исследователей, что связано с постоянно нарастающими процессами временных и постоянных миграций между странами и регионами. Сам

процесс адаптации затрагивает морфологические, физиологические и психологические аспекты, что предопределяет и направления соответствующих исследований.

В работе нами были использованы данные антропологических измерений и психологических опросов для студентов РУДН из различных стран Азии, Африки и Южной Америки, собранные за период с 2013 по 2015 год. Всего было измерено и опрошено 188 мужчин (в возрасте от 17 до 31 года) и 79 женщин (от 17 до 27 лет).

Проводился анализ корреляций между антропометрическими признаками и показателями шкалы самооценки. У мужчин обнаруживается прямая зависимость между удовлетворенностью собственным состоянием здоровья и степенью развития жировой ткани, обхватом бедер и массой тела, а также отрицательные корреляции между длиной тела и оценкой собственной внешности. Для женщин были получены иные корреляции, в частности было отмечено наличие отрицательных связей между индексом эндоморфии и представлением об отношении к ним окружающих.

Для части выборки (85 мужчин и 31 женщина) оценивался показатель адаптационного напряжения по Р.М. Баевскому. И среди мужчин, и среди женщин не выявлено ни одного случая адаптационного срыва, процент случаев удовлетворительной адаптации равен в обеих группах, составляя большинство обследованных. Доля случаев с неудовлетворительной адаптацией по Р.М. Баевскому оказывается выше в мужской выборке.

БИОИНЖЕНЕРИЯ

Использование децеллюляризованного матрикса бедренной артерии человека для протезирования уретры кролика

Брумберг В.А., Астрелина Т.А., Кызласов П.С., Кобзева И.В., Лаук-Дубицкий С.Е., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Добровольская Е.И., Карасева Т.В., Губарев К.К., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С.

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА, Россия, Москва

В настоящее время трансплантология сталкивается с целым рядом нерешенных проблем, связанных с острой необходимостью большого количества донорских сосудистых аллотрансплантантов (аллографтов) маргинального происхождения, с их эффективным, функциональным сохранением и уменьшением нежелательных явлений после их трансплантации. По этой причине большинство современных исследований направлено на разработку тканеинженерных сосудистых аллографтов, что обеспечивает абсолютную гистосовместимость, безопасность, эффективность и сохранение их функциональных свойств. Сосудистые аллографты, полученные от доноров маргинального происхождения, менее склонны к инфицированию в отличие от синтетических биопротезов, однако вследствие индуцированного иммунного ответа подвержены патологической кальцинации и дегенерации. Децеллюляризованные аллографты позволяют получить биоматериалы, полностью или частично лишённые перечисленных недостатков и способные ускорить эндогенное формирование новых тканей. Децеллюляризованные аллографты могут использоваться в реконструктивной сосудистой хирургии и в других областях трансплантологии, поскольку внеклеточный матрикс сосудистых аллографтов выполняют ключевую роль в регулировании поведения контактирующих с ним клеток - их развития, миграции, воспроизведения, формы и функционирования. Таким образом, децеллюляризованные аллографты являются перспективным альтернативным материалом в реконструктивной хирургии.

Целью данной работы явилось получение децеллюляризованного матрикса человеческой бедренной артерии, изъятый от донора маргинального происхождения, для последующего протезирования уретры кролика. Для снижения иммуногенности проводилась децеллюляризация с использованием стандартного детергентно-ферментативного протокола в условиях перфузии растворами ионных (додецилсульфат натрия - SDS) и неионных детергентов (Triton X100) в трубчатой статичной камере, подключенной к перистальтическим головкам проточного биореактора (EBERS TEB500 MasterUnit). При гистологическом исследовании срезов децеллюляризованной артерии (окраска гематоксилином—эозином) выявлено отсутствие ядерного материала с сохранением волокон эластина в медиальном слое, в некоторых срезах было отмечено единичное незначительное разрушение коллагеновых волокон интимального слоя. Полученный стерильный сосудистый ксенографт использовали в качестве протеза при реконструкции уретры лабораторного кролика (полное замещение), весом 5 кг, согласно правилам по работе с лабораторными животными. В посттрансплантационном периоде отмечалось адекватное функционирование ксенопротеза, отсутствие иммунологического отторжения, инфицирования. Вывод животного из эксперимента был осуществлен через 2 месяца. При гистологическом исследовании сформированной уретры (окраска

гематоксилином—эозином) выявлено формирование переходного эпителия на всем протяжении ксенопротеза.

Таким образом, стандартный детергентно-ферментативный протокол позволяет добиться эффективного удаления ядерного материала клеток, их цитозольных компонентов и мембран, что обеспечивает получение неиммуногенного, эффективного и безопасного ксенографта.

Особенности структуры компактных динуклеосом

Валиева М.Е.¹, Герасимова Н.С.¹, Кудряшов К.С.^{1,2}

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

²ИБХ РАН, Москва

durnopeyko-maria@rambler.ru

В норме нуклеосомы – структурные единицы хроматина – разделены участками не связанной с гистонами ДНК, однако при АТФ-зависимом ремоделировании хроматина могут образовываться компактные динуклеосомы. Как правило, динуклеосомы изучают в контексте проблемы разрушения хроматина: в 2009 году Engeholm с коллегами выдвинули гипотезу о том, что две нуклеосомы, сближаясь, разрушают друг друга. В 2010 году Dechassa с коллегами, на основании экспериментальных данных, предложили механизм работы АТФ-зависимого комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF: комплекс сталкивает две нуклеосомы, что приводит к потере одной из них. Обе концепции предполагают, что два октамера гистонов, сближаясь, способствуют отворачиванию нуклеосомной ДНК. Это предположение было проверено нами в прямом эксперименте, с использованием флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и комплексов на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопия).

Нами была разработана *in vitro* система, позволяющая осуществлять структурные исследования динуклеосомных тандемов. Были получены ДНК-матрицы, состоящие из позиционирующей нуклеосому последовательности (146 п.о.) и дополнительной последовательности (136 п.о.), с которой может взаимодействовать второй октамер гистонов. Биохимическими методами была доказана возможность формирования компактных динуклеосом на полученной ДНК-матрице. В позиционирующую последовательность были внесены флуоресцентные метки Су3 и Су5 так, что при укладке на гистоновом октамере между ними происходил FRET. Суммарно было получено и проанализировано 6 конструкций: во-первых, моно- и динуклеосомы, несущие флуорофоры Су3/5 в зоне взаимодействия ДНК с димером гистонов Н2А/Н2В ближайшем ко второй нуклеосоме. Во-вторых, моно- и динуклеосомы, несущие флуорофоры в зоне взаимодействия ДНК с тетрамером Н3/Н4. В-третьих, моно- и динуклеосомы, несущие флуорофоры в зоне взаимодействия ДНК с димером гистонов Н2А/Н2В дальнем от второй нуклеосомы. Результаты spFRET микроскопии указывают на то, что сближение гистоновых октамеров вызывает нарушение структуры нуклеосом и появление напряжения по всей длине нуклеосомной ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда (грант № 14-24-00031).

**Разработка алгоритма расчета интерфейса взаимодействий токсинов
скорпиона с потенциал-зависимыми калиевыми каналами**

Волынцева Алена Дмитриевна, Новоселецкий Валерий Николаевич
МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
alenskavolynceva@gmail.com

Калиевые (K⁺) каналы пронизывают клеточную мембрану и регулируют поток ионов калия. Они играют важную роль в возбудимых и невозбудимых клетках и обнаружены практически у всех видов, кроме некоторых паразитов. Калиевые каналы играют важную роль в диагностике и лечении различных заболеваний. Особый интерес представляет терапевтический потенциал различных селективных блокаторов, например, токсинов, выделенных из яда скорпионов.

Целью настоящей работы было провести анализ интерфейса связывания пептидного блокатора аджитоксина (AgTx) и ряда его мутантов с гибридным каналом KcsA-Kv1.1. Остов гибридного канала составляет бактериальный канал KcsA, последовательности Р-петель которого заменены на соответствующие от Kv1.1. Комплекс канала с аджитоксином был построен по гомологии с комплексом гибридного канала Kv1.2-2.1 с харибдотоксином (PDB ID 4JTA).

Для полученных систем были произведены молекулярно-динамические расчеты с использованием программного пакета Gromacs (<http://www.gromacs.org>) и полноатомного силового поля charmm. Выбор предпочтительной ориентации был произведен с помощью анализа распределения углов поворота токсина в отдельных фреймах траектории молекулярной динамики. Анализ гидрофобных и стекинг-взаимодействий, водородных и ионных связей токсина и калиевого канала производился с помощью программы Platinum.

В результате работы выявлены ключевые взаимодействия, объясняющие различия в аффинности аджитоксина и его мутантов при связывании с каналом. Проведенный анализ контактов, образующихся при связывании канала с токсинами, будет использован для проектирования новых мутантных форм токсинов, обладающих повышенной аффинностью и селективностью при связывании с каналами.

Работа велась при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-14-00239 от 14.07.2014 «Исследование молекулярных основ селективности взаимодействия пептидных блокаторов с калиевыми каналами» (Руководитель – Феофанов А.В.). Работа выполнена с использованием ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Анализ и предсказание профилей гидроксильного
расщепления ДНК в составе нуклеосом**
Ефимова Дарья Андреевна, Армеев Григорий Алексеевич
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Россия, Москва
dar9468@yandex.ru

Понимание механизма взаимодействий белок-ДНК является важной задачей молекулярной биологии. Существует несколько экспериментальных методов для решения данной проблемы, таких как рентгеноструктурный анализ, ЯМР, FRET, нуклеазный и гидроксильный футпринтинг ДНК. Метод гидроксильного футпринтинга позволяет картировать взаимодействия ДНК с белком с довольно высоким разрешением. Механизм

метода заключается в расщеплении цепи ДНК в местах, не защищенных белками. Одним из наиболее интересных комплексов ДНК с белками является нуклеосома. По анализу футпринтов можно судить о том, с какими парами нуклеотидов взаимодействуют гистоны и насколько сильны эти взаимодействия. Помимо этого метод позволяет определять места взаимодействия нуклеосомальной ДНК с транскрипционными факторами и разнообразными белками, входящими в состав хроматина.

Заключительным этапом эксперимента по гидроксильному футпринтингу является денатурирующий электрофорез в агарозном геле, таким образом, данные гидроксильного футпринтинга нуклеосом представляют собой изображения электрофоретических гелей. Несмотря на то, что такого рода изображения позволяют наглядно и качественно демонстрировать наличие или отсутствие взаимодействий, количественный анализ информации в данной форме затруднен.

В результате работы был разработан алгоритм анализа гелей гидроксильного футпринтинга. Была написана программа для получения информации о количественных данных о геле, с помощью которой облегчился способ нахождения пар нуклеотидов, взаимодействующих с гистонами, и вероятности разрыва цепи ДНК. Так же была рассчитана площадь поверхности доступной растворителю, для предсказания вероятности разрыва цепи ДНК.

**Конструирование библиотеки активного центра бутирилхолинэстеразы в векторе для экспрессии фермента на поверхности дрожжевой клетки *Pichia Pastoris*
Карцева О.В.¹, Степанова А.В.²**

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия, Казань

²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва
olechkakar@mail.ru, avkaznacheeva@gmail.com

Человеческая бутирилхолинэстераза (БуХЭ) является перспективным биологическим антидотом при терапии отравлений фосфорорганическими токсинами и некоторыми наркотическими веществами, например, кокаином. Данная работа была направлена на создание комбинаторной библиотеки гена BUCHE кодирующего БуХЭ, с целью получения фермента, обладающего способностью к реактивации при ковалентном ингибировании фосфорорганическими соединениями.

На основе анализа кристаллических структур БуХЭ (PDB№ 1P0I), а также ее ковалентных аддуктов с экотиофатом (PDB№ 1XLV, 1XLW) и зоманом (PDB№ 1P0Q), был проведен дизайн библиотеки активного центра БуХЭ. Для замены были выбраны аминокислотные остатки петли 284-288, находящиеся вблизи ацил-связывающего кармана активного центра фермента. Известно, что петля содержащая аминокислотные остатки 284-288 является ключевой для обеспечения реактивации БуХЭ, выделенной из плазмы крови свиней. Были проведены замены на положительно заряженные аминокислотные остатки: аргинин и лизин, а также гистидин. Было сконструировано 3 праймера с вырожденными кодонами на месте подлежащих замене аминокислотных остатков и два фланкирующих праймера для лигирования в плазмидный вектор. Библиотека была создана методом ПЦР с использованием перекрывающимися праймерами. Далее библиотеку клонировали в плазмидный вектор pPic9k flag anchor, который позволяет

экспрессировать фермент на поверхности клетки, и трансформировали методом электропорации в электрокомпетентные клетки *E. Coli* для амплификации библиотеки. После выделения и очистки плазмидную ДНК, содержащую целевую библиотеку, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *PmeI*, с целью обеспечения встраивания в локус гена АОХ-1, и последующей трансформации в клетки линии GS115 дрожжей *P. Pastoris*.

В результате проведенной работы была получена библиотека петли 284-288 с представительностью $2,5 \times 10^5$ вариантов мутантов. Из-за невозможности выбора кодона кодирующего только три аминокислоты подлежащие замене, комбинаторная библиотека избыточна по своей представительности. Данная библиотека предназначена для проведения отбора мутантов с соответствующей каталитической активностью методом высокопроизводительного скрининга в каплях двойной эмульсии вода/масло/вода.

Анализ цитотоксичности остеозамещающих материалов *in vitro*

Касьянова Елизавета Сергеевна

*Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого,
кафедра медицинской физики, Россия, Санкт-Петербург*

k_elisa@bk.ru

В современной костной пластике большую значимость приобретает использование остеозамещающих материалов с определенными свойствами. Их преимуществами являются: неограниченное количество, различные типы и размеры, возможность замещения костных дефектов любой формы, снижение продолжительности операции и риска. Важным этапом оценки биологического действия материалов, которые предполагается использовать в качестве медицинских изделий, является проведение тестирования *in vitro*. Первым по важности критерием оценки является отсутствие токсичности материала по отношению к клеткам того типа, с которым предполагается его взаимодействие в организме. В 2015 г. совместно с сотрудниками ФГБУ «Санкт-петербургский НИИ Фтизиопульмонологии» начаты исследования по выбору оптимального остеозамещающего материала для пластики операционных дефектов костного туберкулеза.

Целью настоящей работы являлась оценка цитотоксичности следующих материалов: Биосит Ср-”Элкор”(ООО ПК “Элкор”), Osteoset (Wright Medical Technology, SA), Orthoss (Geistlich, Germany) и ЛитАр (ЗАО “ЛитАр”, Самара). Исследование проводили на клетках постоянной клеточной линии остеосаркомы человека HOS (TE 85, CLONE F5), мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК) костного мозга кролика и остеоцитах, полученных из ММСК методом индукции. Для визуальной оценки морфологических изменений при инкубации клеток с экстрактами материалов использовали инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS100. Относительное количество жизнеспособных клеток после инкубации с экстрактами материалов определяли с помощью МТТ-теста. Оптическую плотность (ОП) растворенных кристаллов формазана измеряли на спектрофотометре Fluorofot «Charity».

Анализ морфологических изменений при инкубации клеток трех типов в течение 7 сут в присутствии экстрактов таких материалов как Биосит Ср -”Элкор” и Orthoss не выявил никаких существенных изменений общей морфологии клеток. Однако инкубация клеток в присутствии экстрактов Osteoset вызвала такие процессы, как клеточная гипертрофия, увеличение количества вакуолей в цитоплазме, открепление клеток от

подложки и постепенная гибель клеток. Воздействие экстрактов ЛитАр на клетки привело также к изменению их формы (клетки становились более вытянутыми, веретеновидными), увеличению количества включений и гибели клеток. Количественная оценка с помощью МТТ-теста жизнеспособных клеток, инкубировавшихся в присутствии экстрактов Биосит СР-”Элкор” и Orthoss, не выявила токсического воздействия материалов на клетки всех трех типов (ОП клеток в опыте совпала с ОП клеток в контроле). Однако после инкубации клеток в течение 1 сут с экстрактами Osteoset и ЛитАр ОП клеток всех типов снижалась примерно в 1,5 раза. Исключение касалось остецитов, для которых было выявлено, что относительное количество жизнеспособных клеток под воздействием ЛитАр практически не изменялось по сравнению с контролем.

В данном исследовании показано, что материалы Биосит СР-”Элкор” и Orthoss не влияют на общую морфологию и жизнеспособность клеток трех линий остеогенной природы и являются перспективными для использования в качестве заполняющих дефекты костной ткани материалов.

Изучение динамики амплификации генетических конструкций, кодирующих субъединицы лютеинизирующего гормона человека, в геноме клеток-продуцентов при использовании двух амплифицируемых маркеров устойчивости

Кондрашова Мария Павловна, Ходак Ю.А., Ковнир С.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И.

*Институт Биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва
kondrashova.m.p@gmail.com*

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) – гликопротеин, состоящий из двух нековалентно связанных субъединиц. ЛГ человека широко используется в медицине для стимуляции овуляции при бесплодии. Используемые в мире лекарственные препараты ЛГ получены на основе линий клеток яичника китайского хомячка (СНО). Вследствие того, что относительный уровень экспрессии генов, кодирующих субъединицы ЛГ в клетках-продуцентах, может значительно различаться, возможна секреция клетками смеси гетеродимера ЛГ и одной свободной субъединицы.

Для получения высокопродуктивных линий-клеток, секретирующих преимущественно гетеродимер ЛГ, нами было предложено использовать два генетических вектора с взаимно совместимыми амплифицируемыми маркерами устойчивости – дигидрофолатредуктазой (DHFR) и глутаминсинтетазой (GS), вводить их в геном клеток методом ко-трансфекции и затем балансировать относительные уровни биосинтеза и секреции цепей ЛГ амплификацией соответствующего целевого гена под действием возрастающих концентраций ингибитора селекционного маркера – метотрексата или метионилсульфоксимиона.

Ранее в нашей лаборатории были получены векторы семейства p1.1, которые содержат функциональные участки, многократно увеличивающие вероятность интеграции генетической конструкции и частоту ее амплификации в геноме. Эти участки основаны на длинных некодирующих фрагментах гена фактора элонгации трансляции 1a китайского хомячка и фрагменте конкатемера концевой повтора вируса Эпштейна-Барр.

Были получены синтетические гены альфа- и бета- субъединиц ЛГ и клонировали их в векторы семейства p1.1 с маркерами устойчивости GS и DHFR. При помощи клеток

суб-линии СНО DG-44 были получены стабильно трансфицированные популяции, секретирующие гетеродимер ЛГ и мономеры субъединиц. Было установлено, что при повышении концентрации селекционного агента в стабильно трансфицированной популяции клеток увеличивается титр гетеродимера ЛГ и копияность в геноме клеток гена соответствующей субъединицы ЛГ.

Полученные поликлональные популяции клеток, секретирующие ЛГ человека, пригодны для изучения возможности балансировки уровней экспрессии пары целевых генов путем направленной амплификации целевых генов в геноме клеток-продуцентов.

Работа проведена при поддержке РФФИ, проект номер № 16-34-01026.

Создание тканеинженерного эквивалента хрящевой ткани

с использованием полилактида

Копелев Павел Владимирович

*Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, кафедра
медицинской физики, Россия, Санкт-Петербург*

paха94@bk.ru

В настоящее время болезни суставов занимают второе место в мире после заболеваний сердечно-сосудистой системы. Незначительные повреждения хрящевой ткани можно лечить медикаментозно. В более серьезных случаях из-за недостаточной способности хряща к регенерации приходится прибегать к трансплантации. Одним из наиболее разработанных способов такого лечения является аутологичная трансплантация хондроцитов. Однако существует проблема фиксации вносимых клеток в месте повреждения. Работы, которые проводятся в настоящее время, касаются как подбора биodeградируемого материала со свойствами высоко организованного плотного межклеточного матрикса хряща, так и выявления подходящего типа клеток и способа введения клеток в матрикс. Целью настоящего исследования являлось тестирование *in vitro* возможности использования полилактида и его композита с коллагеном в качестве носителя для хондроцитов.

Эксперименты проводили с использованием диплоидной культуры хондроцитов новорожденного кролика, выделенных из суставного хряща. В качестве материала-носителя клеток тестировали поли(L,L)-лактид с вязкостью $\eta=4.0$ дл/г (Sigma, США). Клетки наносили либо на прикрепленные к покровным стёклам прозрачные полилактидные плёнки, либо на трехмерные скаффолды, изготовленные методом выщелачивания. На скаффолды клетки наносили как путем адгезии клеточной суспензии в минимальном объеме ростовой среды, так и в составе геля из коллагена I типа. Морфологию клеток изучали с помощью прижизненной инвертированной световой микроскопии. Жизнеспособность хондроцитов оценивали в следующих вариантах опыта: 1) клеточную суспензию или клетки в составе коллагенового геля наносили на нативный или проинкубированный в ростовой среде скаффолд; 2) клетки инкубировали в экстракте из материала; 3) культивировали монослой клеток в присутствии материала. Через 1 сут проводили МТТ-тест.

В ходе исследований было выявлено, что полилактидные скаффолды не являются токсичными для хондроцитов кролика. Хондроциты на пленках из полилактида через 2 сут располагались в виде небольших скоплений (10-20 клеток). По сравнению с клетками на стандартном пластике для культивирования они принимали более компактную

полигональную форму, у них было меньше межклеточных контактов. В составе коллагенового геля клетки приобретали звездчатую форму с вытянутыми филоподиями. В случае композитной конструкции на основе полилактида и коллагена форма клеток была такая же. Статистических различий между оптическими плотностями контрольного и всех исследуемых на жизнеспособность вариантов выявлено не было. Нанесение клеток в составе коллагенового геля и определение с помощью МТТ-теста относительного количества клеток в трехмерном композите показало, что количество жизнеспособных клеток в носителе с коллагеном намного больше количества клеток на полилактидном носителе без него.

В данном исследовании показано, что для создания тканеинженерного эквивалента хрящевой ткани целесообразно применять композитную структуру из твердого полилактидного носителя и коллагенового геля с хондроцитами.

Микроносители на основе фиброина шелка для клеток, участвующих в регенерации кожи

Котлярова М.С., Мойсенович А.М.

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

kotlyarova.ms@gmail.com, a-moisenovich@mail.ru

Микроносители – это частицы из биосовместимых материалов, часто применяемые с целью наработки клеток для клеточной терапии. Доставка клеток, культивируемых на биорезорбируемых микроносителях, может быть осуществлена без снятия клеток с подложки.

Из трехмерных пористых матриц на основе фиброина (Ф) и матриц, содержащих 30% желатина (ФЖ), были получены микроносители. Структуру микроносителей изучали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Изучали пригодность микроносителей для культивирования клеток, участвующих в регенерации кожи. Скорость пролиферации клеток оценивали методом МТТ-теста. Также анализировали рост кератиноцитов методом КЛСМ по флуоресценции GFP, экспрессируемому клетками.

Поверхность Ф- и ФЖ- микрочастиц имела сложную форму, обеспечивающую большую площадь для адгезии клеток, свободный доступ питательных веществ и газообмен. Среди полученных микроносителей обоих типов преобладали частицы размером от 100 до 250 мкм.

Характер роста фибробластов на Ф- и ФЖ-микроносителях существенно отличался. На Ф-микроносителях фибробласты линии 3Т3 активно пролиферировали с первого дня культивирования. На ФЖ-носителях увеличение количества клеток не наблюдалось до 3 дня, после чего скорость пролиферации значительно увеличивалась. К 7 дню культивирования количество клеток на двух типах микроносителей выравнивалось.

Клетки первичной культуры кератиноцитов активно пролиферировали в течение 7 дней на обоих типах микроносителей. Более 95% клеток содержали типичные маркеры кератиноцитов базального слоя – цитokerатины 5 и 14.

Сниженная скорость пролиферации фибробластов на начальных этапах культивирования на ФЖ-микроносителях может позволить создать оптимальные условия для нормального развития кератиноцитов при формировании клеточной композиции.

Таким образом, полученные Ф- и ФЖ-микроносители могут быть использованы для культивирования *in vitro* фибробластов и кератиноцитов – основных типов клеток, участвующих в регенерации кожи.

Работа осуществляется при поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 ноября 2014 г. №14.604.21.0148 "Биорезорбируемые микроносители для доставки клеток в область заживления и регенерации ран", уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0148.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского Университета и на оборудовании ЦКП МГУ имени М.В.Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Функциональная характеристика суставного хряща при ремоделировании в условиях модификации синовиальной жидкости

Крылов Павел Андреевич

Волгоградский государственный университет институт естественных наук,

Россия, Волгоград

p.krylov.volsu@yandex.ru

На сегодняшний день в регенеративной биологии и медицине широкое распространение приобретает биомиметический подход воздействия, в котором положительное воздействие используемых соединений основано на их натуральных биологических свойствах. Примером может служить улучшение лубрикативных свойств синовиальной жидкости при болезнях суставов за счет введения в суставную полость гиалуроновой кислоты, которая является основным естественным компонентом синовиальной жидкости [1]. В данном исследовании внимание было уделено белкам легочного сурфактанта, содержащий 90% фосфолипидов и 10% белков, обеспечивающий снижение силы трения и поверхностное натяжение [2, 3].

Целью работы стало изучение влияния структурной модификации синовиальной жидкости на состояние зон суставного хряща в эксперименте у крыс.

Материалом для экспериментального исследования послужили 15 белых крысах линии Wistar массой 220-280 г. Экспериментальный остеоартроз вызывали путем введения суспензии стерильного талька в соотношении с физиологическим раствором 1:5.

Для выявления структурных и морфологических изменений суставного хряща использовали специфический краситель - сафранином О. Для выявления синтетической активности хондроцитов применяли иммуногистохимические методики. Использовали козы моноκлональные антитела к агрекану, как маркеру синтетически активных хондроцитов зон суставного хряща.

Полученные данные морфометрического анализа позволяет нам наблюдать увеличение плотности экстрацеллюлярного матрикса поверхностной зоны суставного хряща, это свидетельствует снижении нагрузки (силы трения) на поверхностную зону, в связи с этим также происходит увеличение численной плотности хондроцитов и запускаются процессы дифференцировки и пролиферации клеток хондрального ряда. Результаты исследования синтетической активности показали, что произошло увеличение у хондроцитов промежуточной зоны.

Закключение. Полученные данные свидетельствуют об эффективности белков легочного сурфактанта в улучшении лубрикативных свойств синовиальной жидкости, что в свою очередь оказывает положительное действие на поверхностную зону суставного хряща.

Рекомбинантный белковый антиген-партнер fliC:pagN для конъюгированных сальмонеллёзных вакцин

Лисицкая Л.А.

Пуцинский государственный естественно-научный институт РАН, учебный центр

«Нанобиобезопасность», Россия, Пушкино

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и

биотехнологии, Россия, Оболенск

lisidiya@gmail.com

При конструировании конъюгированных вакцин против брюшнотифозной инфекции актуальной проблемой является выбор подходящего белка-носителя для конъюгации с Vi-антигеном *Salmonella typhi*. Нами предложен способ получения рекомбинантного фьюжн-белка fliC:pagN, обладающего свойствами адьюванта и антиген-специфичного модулятора иммунного ответа на сальмонеллы, который может использоваться в качестве носителя для конъюгированных сальмонеллёзных вакцин.

Последовательности ДНК, определяющие синтез белков fliC и pagN, получали при помощи ПЦР с геномной ДНК *S. typhimurium* с использованием специфических праймеров и затем последовательно клонировали в плазмиду pET22b(+). Плазмиду pETfliCpagN трансформировали в клетки штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) и получали единичные колонии продуцента белка fliC:pagN (BL-fliCpagN). На основании аналитической экспрессии и определения уровня содержания рекомбинантного белка в периплазматической фракции выделяли клоны-суперпродуценты белка, анализировали продукцию белка методом электрофореза и помещали на хранение при -70 °C.

Разработанный нами способ получения слитного химерного рекомбинантного белка fliC:pagN включает конструирование рекомбинантной плазмиды pETfliCpagN длиной 7532 п.н., которая несёт последовательности, кодирующие белки fliC, его лидерную последовательность и pagN *S. typhimurium*. Данные последовательности объединены короткой линкерной последовательностью и слиты на 3'-конце с синтетической последовательностью, кодирующей шесть гистидинов. Проведена трансформация клеток *E. coli* BL21(DE3) экспрессионной плазмидной ДНК pETfliCpagN, кодирующей рекомбинантный фьюжн-белок fliC:pagN. Культивирован штамм BL-fliCpagN, продуцирующий фьюжн-белок fliC:pagN.

Полученный нами штамм BL-fliCpagN способен продуцировать химерный рекомбинантный белок fliC:pagN в растворенной форме, который может быть использован в качестве альтернативного белка-носителя для конъюгации с полисахаридными антигенами сальмонелл, в первую очередь с Vi-антигеном, при создании эффективных вакцинных препаратов против брюшнотифозной инфекции.

Автор выражает глубокую признательность научным руководителям к.б.н., в.н.с. Козырь А.В., к.б.н., в.н.с. Колесникову А.В., а также н.с. Рябко А.К. и н.с. Красавцевой О.Н. за помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения о субсидии от 27 июня 2014 г. №14.604.21.0067 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0067).

Эффективность использования лентивирусных векторов для генетической трансформации эмбриональных клеток кур
Меннибаева Эльмира Рефкатовна

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста, Россия, Дубровицы

Лентивирусные вектора являются эффективным инструментом для введения и выражения генов и рассматривается в качестве одного из перспективных способов генетической модификации сельскохозяйственной птицы. Целью работы являлось изучение условий введения трансгенов в эмбриональные клетки кур для оптимизации условий введения лентивирусных векторов в эмбрионы кур в условиях *in vivo*. В работе была использована модифицированная лентивирусная векторная система второго поколения, в состав которой входили три различные плазмиды: psPAX2, pLPG и pWPXL (самоинактивирующийся лентивирусный вектор). Были получены две генные конструкции на основе самоинактивирующегося лентивирусного вектора, содержащие ген eGFP под контролем промотора вируса саркомы Рауса (RSV) или гибридного энхансер-промотора (CAG). Введение вирусных препаратов в эмбрионы кур осуществляли на разных сроках инкубации. Эффективность трансформации и число интегрированных копий трансгена оценивали методом *real-time PCR* (RT-PCR). Путем изменения соотношения плазмид были получены вирусные препараты с титром более 10^7 КОЕ/мл, а после концентрации ультрацентрифугированием – 5×10^8 КОЕ/мл. Было показано, что, изменяя соотношения между компонентами векторной системы по сравнению со стандартной схемой, можно значительно увеличить титр вируса. Полученные титры вирусного препарата позволили инфицировать 30-35 % клеток на ранних этапах развития эмбрионов кур, что указывает на то, что только часть клеток эмбриона может быть инфицирована вирусом. При введении вирусных препаратов с одинаковыми титрами в эмбрионы кур на разных сроках инкубации были получены популяции эмбриональных клеток с различным количеством копий вектора в составе клеточного генома. Таким образом, эффективность переноса генов в эмбрионы кур с использованием лентивирусных векторов не зависит от стадии развития эмбриона и может быть прогнозируемой.

Изучение взаимодействия белкового фактора PARP-1 с нуклеосомой методом микроскопии одиночных молекул

Михайлова М.С.¹, Кудряшова К.С.^{1,2}, Любителев А.В.¹, Герасимова Н.С.¹

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

²ИБХ РАН, Россия, Москва

mashkuna@yandex.ru

PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase 1) – мультифункциональный фермент, который катализирует реакцию поли-АДФ-рибозилирования. Он является важным

посредником в процессах репарации ДНК и участвует в организации структуры хроматина. Функции этого фермента, относящиеся к регуляции транскрипции и способности к ремоделированию хроматина, в настоящее время только начинают активно исследоваться.

Изменения в структуре нуклеосомы, происходящие при взаимодействии с PARP-1, могут быть глубже изучены с помощью экспериментальных подходов, основанных на микроскопии одиночных молекул и эффекта Фёрстеровского резонансного переноса энергии (single particle FRET, spFRET). Методом spFRET микроскопии анализируют тысячи нуклеосом, что позволяет изучать и сравнивать структурно различающиеся субпопуляции нуклеосом.

Для изучения взаимодействия с PARP-1 были сконструированы одиночные строго позиционированные нуклеосомы, содержащие флуоресцентно-меченые линкеры длиной 40 п.н. каждый. Анализ конформационных изменений, происходящих в линкерной части нуклеосомы, осуществляли статистической обработкой данных spFRET микроскопии. Показано, что при инкубации нуклеосом с PARP-1 происходит увеличение эффективности FRET, что говорит о сближении линкеров и образовании комплексов. При аутомодификации PARP-1 сближения линкеров не наблюдается. Для исключения взаимодействия PARP-1 со свободными концами ДНК, были получены и исследованы нуклеосомы с ковалентно замкнутыми шпилечными концами.

Данные, полученные независимым методом микроскопии одиночных молекул, открывают новые возможности для более подробного изучения структурных изменений, происходящих в нуклеосоме при взаимодействии с PARP-1, а также с его ингибиторами и мутантными формами.

Авторы благодарят д.б.н. В.М.Студитского и д.б.н. А.В.Феофанова за организацию и координирование исследований.

Влияние инулина на выход микроорганизмов из некультивируемого состояния

Скорлупкина Н.Н.^{1,2}, Чистякова Д.А.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени
И.И.Мечникова, Россия, Москва
nadezhdaskor@yandex.ru

Некультивируемое состояние (НС) микроорганизмов появляется в ответ на воздействие стресса и характеризуется обратимой потерей способности к размножению на питательных средах. Наличие некультивируемых клеток (НК) может внести неясность на результаты исследования микрофлоры человека и постановку неверного диагноза или лечения. Вследствие этого интересно посмотреть, как влияют на восстановления из НС патогенных и непатогенных представителей микробиоты вещества и метаболиты, важные для функционирования макроорганизма.

Целью исследования является изучение влияния инулина на выход микроорганизмов из НС.

Для исследования взяты штаммы *Salmonella enterica* Typhimurium 79 (условно-патогенный микроорганизм, Gr-) и *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 729 (условно-симбиотический, Gr+), находившиеся в НС 8мес и 32мес соответственно. Как фактор

пробуждения использовали инулинсодержащий порошок топинамбура (содержание инулина около 70%) или чистый инулин (~95%), которые добавляли в бульон в концентрациях 0,1%, 1% или 10%. Пробы брали через 0, 24 и 48ч. и определяли общую численность клеток в камере Горяева, КОЕ/мл, оптическую плотность суспензии, жизнеспособность клеток, окрашенных смесью ДНК-тропных красителей Live/Dead, при флуоресцентной микроскопии.

При инкубации клеток сальмонелл с порошком топинамбура в концентрации 1% через 48ч количество НК достоверно снизилось до 7% против контроля 81%. Другую ситуацию наблюдали для чистого инулина: уже через 24ч количество клеток в НС изменилось до 37% против контроля 90%, через 48ч 13% против 70%.

Культура лактококков вела себя другим образом: в не зависимости от концентрации топинамбура или инулина через 48ч количество НК составило около 57%.

Сальмонеллы при содержании 1% топинамбура или инулина достоверно ускоряли выход из НС, при других концентрациях такого эффекта не отмечено. Вероятно, малые концентрации вещества недостаточны, чтобы произвести позитивный эффект, а при больших дозах проявляется подавляющее действие. В культуре лактококков количество НК не изменялось в не зависимости от концентрации веществ. Возможно, это связано с тем, что культура находилась в НС более 2 лет и частично потеряла способность восстановления в вегетативное состояние.

β-Бунгаротоксины – лиганды калиевых потенциал-зависимых каналов семейства Kv1

Филиппова Е.Д., Кудряшова К.С.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, Москва

ИБХ РАН, Россия, Москва

filipv.kate@gmail.com

Калиевые потенциал-зависимые каналы семейства Kv1 широко представлены в клетках различных тканей организма человека, участвуя в поддержании потенциала покоя, регуляции частоты нервного возбуждения, процессах высвобождения нейромедиаторов, кальциевой сигнализации, контроле объема, секреции, пролиферации и миграции клеток. Нарушения нормальной работы Kv1 каналов связывают с развитием многих заболеваний, терапия которых в ряде случаев возможна путем селективного блокирования каналов высокоаффинными лигандами.

Для поиска лигандов каналов Kv1 в яде *B.multicinctus* нами была использована новая клеточная тест-система на основе гибридных каналов KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе внутренней мембраны сферопластов *E.Coli* и флуоресцентно-меченого блокатора каналов Kv1.x. KcsA-Kv1.x были получены путем встраивания лиганд-связывающих сайтов Kv1.x каналов человека в гомологичный участок бактериального канала KcsA. Проведено исследование шести изоформ β-бунгаротоксина, найденных в яде *B.multicinctus*. При одновременной инкубации сферопластов с β-бунгаротоксинами и флуоресцентно-меченым блокатором каналов между токсинами и блокатором обнаружено конкурирование за сайт связывания, детектируемое методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

β-Бунгаротоксины из яда крайта *Bungarus multicinctus* известны своей способностью модулировать калиевый ток через мембрану клетки, но сведения о типах

калиевых каналов, которые являются их мишенью, до настоящего времени отсутствовали. Нами впервые показано, что β -бунгаротоксины являются лигандами и, по-видимому, блокаторами каналов Kv1.x (x=1,3,6) человека. Установлено, что β -бунгаротоксины взаимодействуют с каналами Kv1.x в наномолярном диапазоне концентраций. Проведен масс-спектральный анализ токсинов и охарактеризована их фосфолипазная активность.

Авторы благодарят д.б.н. Ю.Н. Уткина и к.х.н. О.В. Некрасову за сотрудничество в изучении β -бунгаротоксинов.

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Ранние стадии репаративного остеогенеза при травматическом повреждении костей

Абызова М.С.¹, Плакса И.Л.², Мавликеев М.О.³, Бозо И.Я.⁴

¹ ГБОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет, Россия, Казань

² ПАО Институт стволовых клеток человека, Россия, Санкт-Петербург

³ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

⁴ ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет

имени А.И. Евдокимова, Россия, Москва

abyzovamary@mail.ru

Репаративный остеогистогенез, лежащий в основе восстановления костной ткани после ее повреждения, реализуется лишь при оптимальных условиях тканевого и клеточного окружения. Целью исследования был анализ процессов регенерационного гистогенеза «грануляционной ткани» в параоссальных гематомах длинных трубчатых костей человека.

В работе проведено исследование параоссальных гематом, полученных в ходе реконструктивного оперативного лечения от 10 пациентов на 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 и 23 сутки после перелома кости. Для оценки патоморфологических изменений «грануляционной ткани» были использованы гистологические и иммуногистохимические методы исследования (антитела к alpha-sma, нейрофиламентам, PCNA, HLA-DR, CD-31, VEGF, Flk-1 и Flt-4).

Установлено, что через сутки после формирования параоссальной гематомы среди эритроцитов обнаруживались единичные макрофаги. На 3 сутки отмечали появление богатых слабооксифильной цитоплазмой овальных одноядерных клеток, по-видимому, мигрировавших в формирующемся матриксе, определялись клетки фибробластического дифферона, располагавшиеся преимущественно вокруг единичных кровеносных сосудов, где также выявляли единичные клетки, содержащие PCNA-положительные ядра (ИП в периваскулярном пространстве = 0,36). На 5 сутки количество сосудов возрастало до 2-3 в поле зрения, что сопровождалось пролиферацией эндотелиоцитов (ИП=0,8), отмечали появление коллагеновых волокон. На 6-7 сутки констатировали увеличение количества пролиферирующих клеток в бессосудистой зоне образованного матрикса (ИП=0,68) и равномерное их распределение, что свидетельствовало о миграции клеток из периваскулярного пространства, где ИП снижался до 0,53; значительное количество фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), клеток, экспрессирующих рецепторы Flk-1, Flt-4. Через 8 суток на всей площади препарата была выражена молодая соединительная ткань, в область регенерата проросли периферические нервы. Через 10-12 суток отмечали появление ретикулофиброзной костной ткани, что выражалось активным формированием остеоида, пролиферацией преостеобластов и остеобластов (положительная реакция с антителами к PCNA, ИП=0,29).

Исследование показало, что в течение репаративной регенерации в параоссальных гематомах наблюдается последовательная смена регенерационных гистионов: макрофагального, эндотелиально-фибробластического, фибробластического, остеобластического. Дальнейшие исследования должны выявить молекулярные и клеточные эффекторы ангиогенеза, что может быть впоследствии использовано при разработке остеопластических материалов, способных создать оптимальные условия для

репаративного остеогенеза через индукцию роста и развитие сосудов микроциркуляторного русла.

Коллектив авторов выражает благодарность научному руководителю к.м.н. Роману Вадимовичу Дееву за помощь в интерпретации результатов и анализе полученных данных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а № 16-34-00440.

Экспрессия маркеров функционального состояния фолликулярных клеток при сокультивировании стромальных клеток с овариальными фолликулами *in vitro*

Багаева Т.С.

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

tclebedeva@gmail.com

Достижения в области противоонкологического лечения, являющегося причиной потери репродуктивных функций у женщин, ставят перед исследователями новые задачи в разработке эффективных подходов сохранения фертильности. Активно ведутся исследования по культивированию овариальных фолликулов *in vitro* с целью получения компетентных к оплодотворению яйцеклеток. Сокультивирование фолликулов со стромальными клетками, вырабатывающими необходимые для нормального фолликулогенеза факторы - перспективное направление развития данной области исследований, требующее детального изучения.

Культивирование контрольных и опытных групп проводили в системе "висячая капля" в ростовой среде с добавлением 10% FSC, гентамицина, ITS, b-FGF, L-глутамин, гепарина в течение 7 дней. Анализ экспрессии маркеров функционального состояния фолликулярных клеток проводили с помощью методов ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимии

Ранее нами показано, что культивирование овариальных фолликулов в течение 7 суток в системе "висячая капля" приводило к достоверному увеличению их размеров. В данной работе мы показали, что, наряду с ростом фолликулов, возрастал уровень экспрессии мРНК генов ферментов синтеза эстрогенов (CYP19A1) и андрогенов (CYP17A1), рецепторов фолликулостимулирующего (FSHR) и лютеинизирующего (LHR) гормонов. Таким образом, уровень экспрессии этих генов можно считать показателями функционального состояния фолликула. При культивировании фолликулов совместно с клетками стромы происходило формирование единой структуры, в которой клетки занимали поверхностное положение. При этом добавление в систему как клеток первичной культуры стромы яичника, так и стромы костного мозга приводило к достоверному увеличению экспрессии всех исследуемых генов по сравнению с фолликулами, культивированными одиночно.

Для выяснения источников наибольшего вклада в наблюдавшееся увеличение экспрессии исследуемых генов, были поставлены эксперименты по сокультивированию овариальных фолликулов мыши с клетками стромы яичника человека, и проведен количественный ПЦР-анализ исследуемых генов с использованием видоспецифичных праймеров. Значимые различия выявлены только в экспрессии генов мыши, но не человека.

Таким образом, сокультивирование овариальных фолликулов мыши с клетками первичной культуры стромы яичника человека приводило к активации процессов

стероидогенеза в самом фолликуле, но не в клетках. Данный результат может говорить о том, что добавление стромальных клеток к овариальным фолликулам стимулирует в них экспрессию функционально значимых для нормального роста и развития генов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01217 мол_а.

**Получение инсулин-продуцирующих клеток
из клеток поднижнечелюстной слюнной железы человека**

Борисов М.А.^{1,2}

¹*Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН*

²*Российский национальный исследовательский медицинский университет*

имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

Borisov.mikhail2011@yandex.ru

Одним из широко исследуемых подходов для лечения инсулин-зависимого сахарного диабета, на данный момент, является клеточная терапия, заключающаяся в разработке методик получения инсулин-продуцирующих клеток. Ряд научных работ был посвящен поиску непанкреатического источника клеток, способных к экспрессии инсулина. Было показано, что поднижнечелюстные слюнные железы экспрессируют мРНК и белок инсулиноподобных веществ и способны выполнять компенсаторную функцию при диабете. Таким образом, исследования панкреатической дифференцировки клеток поднижнечелюстной слюнной железы для получения инсулин-продуцирующих клеток являются перспективными.

В связи с чем, целью данной работы являлось: получить *in vitro* инсулин-продуцирующие клетки из клеток поднижнечелюстной слюнной железы человека.

Для работы были использованы культуры, полученные из биоптатов от четырех пациентов мужского пола в возрасте от 37 до 55 лет. Полученные культуры были охарактеризованы фенотипически, после чего дифференцированы по разработанному протоколу в 2D и 3D условиях культивирования. Результаты анализировали методами проточной цитометрии, иммуноцитохимии, ИФА и ПЦР-РВ.

Методами иммуноцитохимии и проточной цитометрии было показано увеличение экспрессии проинсулина и инсулина (с 32 до 77% и с 5 до 88% соответственно) в клетках слюнной железы после дифференцировки. Эти данные были подтверждены с помощью ПЦР-РВ анализа, который показал также рост экспрессии генов транскрипционных факторов, необходимых для формирования инсулин-продуцирующих клеток. Анализ экспрессии мРНК маркеров, характерных для различных типов клеток поджелудочной железы, показал дифференцировку именно в β -подобные клетки.

Методом ПЦР-РВ было продемонстрировано повышение эффективности дифференцировки КСЖ человека в 3D условиях культивирования относительно 2D условий, что показано увеличением экспрессии мРНК как генов, необходимых для формирования инсулин-продуцирующих клеток, так и генов, вовлеченных в глюкозозависимую секрецию инсулина. Иммуноцитохимически подтверждено эндокринное направление дифференцировки в 3D условиях. Методом ИФА показано, что КСЖ после дифференцировки в 3D условиях приобретают способность к глюкозозависимой секреции инсулина. Эндогенная природа секретируемого инсулина

была подтверждена ИФА по С-пептиду, секретирующемуся вместе с инсулином в эквимолярном соотношении.

Таким образом, клетки поднижнечелюстной слюнной железы человека с достаточной эффективностью подвергаются панкреатической дифференцировке *in vitro* в инсулин-продуцирующие клетки, способные к глюкозозависимой секреции инсулина.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках соглашения о предоставлении субсидии №14.610.21.0001 (уникальный идентификатор работы RFMEFI61014X0001).

Первые данные о гермафродитизме беломорской трески *Gadus morhua*

Веретенников Н.А.

Институт проблем Экологии и Эволюции имени А.Н. Северцова, Россия, Москва

Kolyaka91@mail.ru

Одним из важных направлений ихтиологических исследований является изучение репродуктивной системы рыб, в частности, гонад на гистологическом и цитологическом уровнях. Эти исследования выявляют особенности строения, развития и аномалий воспроизводительной системы.

В ходе изучения особенностей строения гонад самок и самцов беломорской трески *Gadus morhua*, были обнаружены 10 особей с гермафродитным составом гонад. Среди них были отклонения 2 типов. У части рыб гонада внешне выглядела нормальной женской железой на II стадии зрелости, но на гистологических срезах были обнаружены мужские половые клетки – сперматогонии, окружающие ооциты малого роста. У других гонада представлена внешне нормальной мужской железой на V-VI стадии зрелости, но среди многочисленных спермиев были обнаружены женские половые клетки - ооциты малого роста.

Обнаруженные за период работы среди трески особи – гермафродиты – это серьёзное отклонение в развитии гонад у данного вида. Среднее число гермафродитных особей за два года изучения составило 6% – это слишком большое число для появляющихся в природе аномалий, если учесть, что шанс на появление гермафродитной особи в естественных условиях у тресковых рыб составляет примерно 2×10^{-4} . В литературе упоминания о гермафродитных особях трески отсутствуют.

Эта негативная тенденция связана, по-видимому, с сильным химическим загрязнением мест обитания трески, либо с аномальными параметрами окружающей среды (температура, солёность и т.д.), во время раннего онтогенеза рыб. Кроме того, можно предположить, что особи – гермафродиты являются потомками трески, обитавшей в Баренцевом море, где экологическое состояние акватория гораздо хуже беломорской. Дрейфуя, пелагическая икра трески из Баренцева моря могла попасть в Белое. Либо уже взрослые особи с отклонениями мигрировали в Белое море.

Известно, что нарушение в развитии половых желёз могут происходить от разных причин - как внутренних, так и внешних. Каким образом и откуда взялись особи – гермафродиты в изучаемой выборке - неизвестно. Этот вопрос остаётся открытым для изучения в будущем.

Автор глубоко признателен своему научному руководителю д.б.н. Н.В. Беловой за помощь в выполнении данной работы.

Перспективный метод витрификации эмбрионов трансгенных животных

Виноградова Н.Г.¹, Коваленко Д.В.²

¹ Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

² Всероссийский научно-исследовательский институт

овцеводства и козоводства, Россия, Ставрополь

natalyawinogradova@gmail.com

Способность гамет сохраняться в замороженном виде открыла практически неограниченные возможности для ученых и практиков. Метод трансплантации эмбрионов позволяет получать несколько десятков потомков от трансгенных родителей в течение короткого времени и тем самым ускорить селекционный прогресс.

Криоконсервация эмбрионов трансгенных лабораторных и сельскохозяйственных животных, является инструментом для эффективного сохранения результатов работы по получению трансгенных животных и подходом, обеспечивающим возможность быстрого развёртывания исследований на их основе без значительных затрат на содержание популяции.

Сегодня для криоконсервации эмбрионов в медицине используют две технологии: медленного замораживания и витрификации. Оба метода с момента внедрения в клиническую практику прошли множество модификаций для повышения их эффективности, оцениваемой по влиянию на выживаемость размораживаемых эмбрионов и на их способность к имплантации при последующем переносе в полость матки.

Однако в сельском хозяйстве, перспективная технология витрификации при криоконсервации эмбрионов еще не получила широкого применения и требует значительной доработки и усовершенствования.

Применение витрификации вместо медленного замораживания обеспечит получение большего количества жизнеспособных эмбрионов, причем независимо от стадии их развития на момент криоконсервации. Очевидно, что большая выживаемость криоэмбрионов, обеспечивает более благоприятные условия для их селекции. В свою очередь, возможность выбора, для переноса в матку более качественных эмбрионов служит повышению вероятности их последующей успешной имплантации.

Предпочтительность использования витрификации вместо медленного замораживания для криоконсервации эмбрионов, аргументируется не только показателями эффективности, отражающими процент выживаемости размораживаемых криоэмбрионов, но и чисто экономическими соображениями.

Оптимизация и усовершенствование методов криоконсервации и трансплантации эмбрионов трансгенных животных, является актуальной задачей в животноводстве, позволяя повысить эффективность и надёжность работ по созданию криодепозитария ранних эмбрионов трансгенных животных.

Иммуноцитохимический и молекулярно-генетический анализ ткани поврежденного спинного мозга в условиях генно-клеточной терапии

Гилязиева З.Е., Архипова С.С., Мухамедшина Я.О., Гаранина Е.Е.

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия, Казань,
gilazievazarema@mail.ru*

Контузионная травма спинного мозга приводит к потере чувствительности и двигательной активности ниже уровня повреждения, поэтому поиск новых подходов в терапии подобных травм представляется чрезвычайно актуальным. Для стимулирования регенерации и предотвращения развития посттравматических изменений спинного мозга целесообразно применение стволовых клеток крови человека, в частности моноклеарных клеток пуповины, трансдуцированных двумя терапевтическими генами: глиальным нейротрофическим фактором (GDNF) и сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), так как эти гены способствуют восстановлению аксонов и прорастанию сосудов в области повреждения.

С помощью методов молекулярного анализа и электронно-микроскопической иммуно-цитохимии на модели контузионной травмы спинного мозга крыс, которым в эпицентр травмы вводили трансдуцированные аденовирусами Ad5-GDNF и Ad5-VEGF моноклеарные клетки крови пуповины человека, была изучена ультраструктура, фенотип присутствующих клеток и экспрессия гена ргх (ген миелинообразующих шванновских клеток). В качестве контроля исследовали травмированный спинной мозг крыс, не получавших какую-либо терапию.

Установлено, что к 30 суткам происходило значительное уменьшение посттравматической полости спинного мозга в группе с генно-клеточной терапией. Методом ПЦР в реальном времени показано увеличение экспрессии ргх в опытной группе по сравнению с контролем. Эти данные подтверждены электронно-иммуноцитохимическим исследованием с антителами к белку миелина Р0, которое подтвердило наличие в области эпицентра травмы опытной группы большого количества шванновских клеток с единичным миелиновым волокном. Вероятно, экспрессия терапевтических генов усиливала активность шванновских клеток периферической нервной системы, за счет которых частично происходила ремиелинизация аксонов поврежденной области. Иммуноцитохимический анализ выявил большое количество астроцитов, которые располагались преимущественно вокруг ремиелинизирующихся волокон, кровеносных капилляров, а также ограничивали посттравматические полости. Визуализированы клетки активированной микроглии, тканевые макрофаги и трансплантированные моноклеарные клетки. Проведенное исследование объясняет некоторые механизмы стимулирования регенерации спинного мозга в условиях генно-клеточной терапии.

Экспрессия генов *Pdu-mox* и *Pdu-myod* во время ларвального развития и при регенерации у *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta)

Гук Д.В., Козин В.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург
comp090992@mail.ru

Зародышевыми листками называют клеточные пласты, которые возникают во время раннего развития животных и дают начало всем тканям и органам взрослых особей. Основными производными мезодермы являются мышцы, соединительная ткань и целомы, которые появляются в развитии под контролем определенных молекулярно-генетических факторов. У беспозвоночных, за исключением нескольких модельных объектов, эти детерминанты остаются изученными на недостаточном уровне. Наша работа посвящена поиску функций гомологов генов *mox* и *myoD* у нереидной полихеты *Platynereis dumerilii* в нормальном развитии и при регенерации.

Полученный путем искусственного оплодотворения материал фиксировали и изучали методом гибридизации *in situ*, который позволяет выявить мРНК на клеточном уровне разрешения.

У *P. dumerilii* выбранные гены начинали экспрессироваться в клетках энтомезодермы со стадии ранней трохофоры. В гипосфере мРНК *Pdu-mox* была распределена в вентральной части мезодермальной полоски (по всей ее длине), частично перекрывалась с доменом *Pdu-myod*. У метатрохофор экспрессия *Pdu-mox* была приурочена к основанию вентральных хетоносных мешков и более медиально – на месте будущих косых мышц. Домены экспрессии *Pdu-myod* на этой стадии отмечены с двух сторон мезодермальной полоски (вентрально и дорсально), предположительно в формирующихся продольных мышцах. У более поздних личинок экспрессия *Pdu-mox* и *Pdu-myod* охватывала меньшее количество клеток, организованных в посегментно расположенные группы. При регенерации мРНК обоих генов появлялась со второго дня после ампутации в области раны. В случае *Pdu-mox* экспрессия имела метамерный характер, на продвинутых стадиях – была локализована в основании параподий. На ранних сроках регенерации *Pdu-myod*-положительные клетки примыкали к месту ампутации вентральных и дорсальных мышечных пучков, а позднее были распределены вдоль продольных мышц по всей длине регенерата.

Полученные результаты говорят о непосредственном участии выбранных генов в формировании мезодермальных производных, в частности определенных типов мышц. Нами установлена исключительно мезодермальная тканеспецифичность экспрессии *Pdu-mox* и *Pdu-myod*, которую мы связываем со спецификацией отдельных частей мезодермальных полосок. В сходных процессах участвуют гомологи *myoD* и *mox* у позвоночных, тогда как у насекомых эти гены регулируют более поздние этапы миогенеза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (16-34-00472, 16-04-00991) и СПбГУ (1.38.209.2014).

Молекулярно-морфологическая характеристика клональных клеточных культур гепатоцеллюлярной карциномы мыши

Дашенкова Н.О.

Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, группа молекулярно-генетических механизмов онтогенеза, Россия, Москва,

n.goncharova@idbras.ru

Ткань солидных опухолей, в том числе гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), состоит из множества клонов, которые произошли от разных клеток-предшественников (т.н. «стволовых клеток рака») и могут паракринно действовать друг на друга. Важной характеристикой раковых клеток является их способность к эпителио-мезенхимному переходу (ЭМП), который сопровождается потерей межклеточных контактов, смене клеточного фенотипа, приводит к подвижности и инвазии клеток и может способствовать лекарственной устойчивости. Кроме того, на рост и прогрессию опухоли влияет её микроокружение, состоящее из нормальных клеток ткани, иммунных клеток, стромы и мезенхимных клеток, которые могут влиять на опухолевую ткань и способствовать ЭМП. В результате, происходит ремоделирование матрикса, увеличение подвижности и агрессивности метастазирующих опухолевых клеток.

Наши предыдущие исследования были посвящены регуляторному пути *Igf-1*, поскольку он является одним из ключевых в процессе канцерогенеза. Мы показали, что экспрессия *Igf-1* понижена в опухоли ГЦК и повышена в окружающей опухоль ткани, т.е. может паракринно способствовать росту опухоли. Целью данной работы стало выявление изменений в экспрессии некоторых генов ЭМП, а также генов сигнального пути *Igf-1* в различных клеточных популяциях опухолевой ткани ГЦК мыши.

Из первичной культуры ГЦК были выделены и взяты в анализ 8 клональных клеточных культур, которые представляли собой эпителиальные клетки полигональной формы. Также были выделены 3 клеточные линии, каждая из которых являлась потомками единичной клетки, взятой после первого пассажа, причем 2 из 3-х представляли собой более гомогенные структуры, чем первые 8 культур. Методом Western Blot в выделенных клонах было показано наличие белка альфа-фетопротейна – маркера опухолевых клеток ГЦК. Используя метод ПЦР в реальном времени, мы провели анализ полученных популяций на экспрессию основных маркеров ЭМП (*Cdh1*, *Cdh2*, *Stnnb1* и других), генов *Igf-1*, *Igf-1R*, *Igfbp-1*, *Igfbp-2*, *Igfbp-3*, *Igfbp-5*, а также гена *CD44* – маркера стволовых клеток рака, который был выявлен во всех образцах.

Известно, что белок CD44 является интегральным и играет важную роль в клеточной адгезии и миграции, поскольку это рецептор для гиалуроновой кислоты. Одним из главных признаков ЭМП является потеря E-кадгерина (ген *Cdh1*), образующих плотные межклеточные контакты и повышение экспрессии N-кадгерина (ген *Cdh2*), который преимущественно участвует в контактах мезенхимных клеток. Сравнение уровней экспрессии генов *Cdh1* и *Cdh2* позволило выявить культуры клеток ГЦК, которые в большей степени способны к миграции.

Таким образом, соотношение экспрессии генов *Cdh1*, *Cdh2* и *Cttnb1* в клональных культурах, а также различные уровни экспрессии компонентов регуляторного пути Igf-1 отражают гетерогенность клеточной популяции изначальной опухоли по степени выраженности злокачественной трансформации. Изучение изменений в уровне экспрессии ключевых генов канцерогенеза, возможно, поможет разработать индивидуальную терапию пациентов с учетом молекулярно-генетических особенностей конкретной опухоли.

Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00769.

Исследование активности теломеразы при онкогенезе мочевого пузыря

Ефремова Е.С., Налобин Д.С., Алипкина С.И., Козлова М.Д.

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,

кафедра эмбриологии, Россия, Москва

efremovaelena94@gmail.com

Среди злокачественных новообразований рак мочевого пузыря (РМП) занимает пятое место по частоте заболеваемости. Как правило пациенты обращаются к врачам лишь при появлении такого признака, как кровь в моче, что соответствует уже поздним стадиям развития рака, когда лечение затруднено и может привести к ампутации мочевого пузыря. Залогом успешного лечения является ранняя диагностика заболевания. Поскольку одно из наиболее характерных свойств опухолевых клеток - способность к неограниченной пролиферации - пролиферативный потенциал опухолевых клеток тесно связан с наличием в них активной теломеразы.

Целью данной работы являлось исследование активности теломеразы в операционных образцах ткани мочевого пузыря и в клеточных осадках мочи от пациентов с диагнозом РМП с целью разработки ранней неинвазивной диагностики РМП. Для измерения активности теломеразы в данной работе был использован неизотопный метод TRAP (telomeric repeat amplification protocol).

Был проведён анализ активности теломеразы в образцах ткани опухоли мочевого пузыря и клеточных осадках мочи пациентов с диагнозом РМП и пациентов с диагнозом цистит, в качестве контрольной группы. Активность теломеразы выявлялась как в ткани опухоли, так и в клеточном осадке мочи каждого пациента с РМП по сравнению с контролем (цистит).

Таким образом, было показано, что определение активности теломеразы в моче пациентов с диагнозом РМП может детектироваться неизотопным методом TRAP, что даёт возможность использовать данный подход в клинической практике для неинвазивной диагностики РМП на ранних стадиях заболевания.

Спонтанное выделение норадреналина из мозга и периферических органов в онтогенезе у крыс

Иконописцева М.А.

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
severalparts@gmail.com*

Норадреналин (НА) является эндогенным химическим сигналом, который в «критические» периоды развития организма действует в качестве морфогенетического фактора. Органы, синтезирующие НА (головной мозг, надпочечники, орган Цукеркандля), выделяют его в кровь в перинатальном периоде онтогенеза, благодаря чему в крови неонатальных крыс поддерживается его физиологически активная концентрация.

Целью настоящей работы явилась оценка секреторной активности органов-источников НА по его выделению в перинатальном периоде онтогенеза у крыс. В задачи работы входило определение в условиях проточной инкубации уровня спонтанного выделения НА из гипоталамуса, надпочечников и органа Цукеркандля у крыс на 21-й эмбриональный день (Э21), 3-й (П3) и 15-й (П15) дни постнатального развития. Концентрацию НА в инкубационной среде и ткани измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Показано, что в мозге (гипоталамусе) в изучаемый период развития уровень спонтанной секреции возрастал незначительно. В надпочечниках спонтанное выделение значительно увеличивалось к 15-му дню жизни. Пик спонтанного выделения норадреналина из органа Цукеркандля приходился на 3-й день жизни, затем его интенсивность снижалась к 15-му дню. В итоге к П15 основным источником НА остаются надпочечники, и их потенциальный вклад в содержание НА в крови увеличивается. Считается, что к концу второй недели жизни у грызунов происходит окончательное формирование гематоэнцефалического барьера для катехоламинов, поэтому мозг перестает быть источником НА в общей системе циркуляции. К этому же времени происходит инволюция органа Цукеркандля.

Таким образом, оценка выделения НА из гипоталамуса, надпочечников и органа Цукеркандля показала, что в течение рассматриваемого периода перинатального развития крыс надпочечники могут являться самым активным источником НА в крови, тогда как вклад органа Цукеркандля и мозга не является столь значительным.

За помощь в подготовке материалов работы выражаю благодарность моему научному руководителю Бондаренко Надежде Сергеевне и сотрудникам лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-15-01122.

Вспомогательные репродуктивные технологии в создании криобанка генетических ресурсов семейства кошачьих

Кожевникова В.В.

*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Россия, Новосибирск
achtungsa@rambler.ru*

На сегодняшний день вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) позволяют не только лечить бесплодие у человека, но и сохранять исчезающие виды

животных. Семейство кошачьих (*Felidae*) включает в себя 39 видов, причем 25 из них присвоен статус «вымирающие» или «уязвимые» виды (в соответствии с IUCN Red list).

Целью данного исследования являлись оптимизация протоколов криоконсервации семени кошачьих, дозревания ооцитов *in vitro*, а также получения эмбрионов методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) для создания криобанка гамет и эмбрионов кошачьих.

В качестве модельного объекта была выбрана домашняя кошка *Felis catus*, на которой отработывали и оптимизировали протоколы криоконсервации семени, дозревания ооцитов, оплодотворения *in vitro*. Ооциты и сперматозоиды домашней кошки были получены в клиниках г. Новосибирска после плановых операций кастрации и стерилизации. Криоконсервация эпидидимального семени домашних котов проводилась в соломинах в парах жидкого азота с использованием 2 типов коммерчески доступных криопротекторов: CaniPlusChill (Minitube, Германия) и SpermFreeze (FertiPro, Бельгия). Жизнеспособность семени после процедуры замораживания/оттаивания оценивалась с использованием набора VitalScreen (FertiPro, Бельгия), а также флуоресцентных красителей (SYBR/green, PI) с дальнейшей конфокальной микроскопией. Ооциты, извлекаемые из яичников после стерилизации, характеризуются своей незрелостью, поэтому их культивировали в различных по составу средах, содержащих лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны. В качестве сред-кандидатов для дозревания ооцитов были выбраны среды 199 (Sigma) и DMEM (ПанЭко, Россия) с различными модификациями. Также проводили изучение краткосрочного (24 часа) и долгосрочного (48 часов) культивирования ооцитов с использованием различных комбинаций гормонов, в том числе и ростовых факторов.

В ходе исследования SpermFreeze был выбран как наиболее оптимальный криопротектор для замораживания семени домашнего кота, который в дальнейшем будет использован для криоконсервации сперматозоидов диких видов кошачьих. Кроме того, модифицированная 199 культивационная среда (Sigma) была выбрана как наиболее подходящая для успешной подготовки ооцитов к оплодотворению *in vitro*.

Влияние пептида p199 на экспрессию белков внеклеточного матрикса в 2D и 3D культуре дермальных фибробластов человека

Кожина К.В.^{1,2}, Горкун А.А.², Зурина И.М.²

^{1.} ООО «Центр восстановительной медицины», Москва

^{2.} ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

stgork@gmail.com

В настоящее время для подтверждения безопасности и эффективности новых косметических препаратов все чаще используют стандартизированные протоколы исследований, основанные на клеточных и органотипичных культурах *in vitro*, в связи с чем постоянно создаются новые протоколы скринингового анализа на клетках. В данном исследовании, для подтверждения антивозрастной эффективности пептида p199, были выбраны дермальные фибробласты человека, так как они являются основным источником синтеза белков внеклеточного матрикса и, следовательно, мишенью воздействия активных веществ, направленных как на омоложение кожи, так и на ее репарацию, и могут стать адекватной моделью для тестирования биологической активности. Цель нашего исследования заключалась в изучении дозозависимого эффекта пептида p199 на

экспрессию коллагенов I, III и IV типов, а также фибронектина как в 2D, так и в 3D культуре дермальных фибробластов человека.

Первичную культуру дермальных фибробластов получали из биоптата кожи с информированного и добровольного согласия пациента, посредством механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки 0,25% раствором трипсина. Клетки культивировали до 4 (P4) и 18 (P18) пассажей в стандартных условиях (+37⁰C, 5%CO₂) в ростовой среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. 3D культуру фибробластов получали, высевая клетки P4 и P18 на агарозные планшеты в плотности 3000 клеток/мкл. Для анализа использовали культуру клеток P18, в качестве контрольной группы – культуру P4.

Для оценки дозозависимого эффекта аликвоты (500мкл) пептида p199, растворенного в солевом буфере смешивали с полной ростовой средой в соотношении 1:10 и 1:100. Клетки культивировали в присутствии пептида в течение 72ч, фиксировали в 4% растворе параформальдегида (4⁰C, 20минут). Экспрессию коллагенов I, III и IV типов, а также фибронектина детектировали методом иммуноцитохимии, анализ проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV10 (Olympus, Япония).

Результаты исследования показали зависимость увеличения экспрессии коллагена IV типа от концентрации пептида p199 как в 2D, так и в 3D культуре. При этом, в отличие от монослоя клеток, экспрессия коллагена IV типа во внеклеточном пространстве присутствовала только в сфероидах экспериментальной группы и отсутствовала в сфероидах контрольной группы, что является эффективным и высокочувствительным показателем антивозрастного воздействия пептида p199. Различия в экспрессии коллагенов I и III типов в зависимости от концентрации активного вещества были выявлены только в 3D культуре. Экспрессия фибронектина коррелировала с увеличением концентрации пептида p199 и в 2D и в 3D культуре. Кроме того, в 3D культуре было установлено увеличение синтеза фибронектина во внеклеточное пространство внутри сфероида и формирование единой фибронектиновой сети при увеличении концентрации препарата.

Таким образом, 3D культура оказалась более чувствительной к воздействию препарата пептида p199 и позволила оценить не только наличие или отсутствие экспрессии белков внеклеточного матрикса, но и формируемую ими структуру в трехмерной модели.

Формирование компонентов серотонинергической системы в эмбриональном тимусе Конеева Ц.О.¹, Лифанцева Н.В.²

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет

² Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва
tsagan1995@mail.ru

Исследование роли серотонина в пренатальном развитии имеет особое значение, поскольку при формировании различных структур плода реализуются эпигенетические механизмы, обеспечивающие адаптационную пластичность всех систем организма. Ранее было показано, что дефицит серотонина в период активного формирования тимуса у плодов крыс приводит к необратимым морфогенетическим изменениям в функционировании Т-клеточного звена иммунитета в постнатальной жизни. Однако

механизмы такого действия серотонина остаются невыясненными. У половозрелых животных все компоненты серотонинергической системы (синтез, захват, рецепторы) тем или иным образом задействованы в модуляции иммунных реакций. Возможность синтеза серотонина и его захвата в клетках иммунной системы, а также экспрессия рецепторов в пренатальном онтогенезе не изучены. В работе исследовали формирование компонентов серотонинергической системы в клетках тимуса у плодов крыс.

С помощью полимеразной цепной реакции выявляли экспрессию рецепторов к серотонину 1a, 1b, 2a, 2b и 7 типов в клетках тимуса начиная с 16-го дня эмбрионального развития. Ферменты синтеза серотонина - триптофангидроксилаза и декарбоксилаза ароматических аминокислот обнаружены в тимусе плодов начиная с 16-го дня с помощью полимеразной цепной реакции и Вестерн-блоттинга. Инкубация эмбриональных тимусов *ex vivo* в присутствии предшественников серотонина (триптофана или 5-окситриптофана) с последующим иммуногистохимическим выявлением серотонина позволила доказать, что обнаруженные ферменты функционально активны. Способность тимоцитов на 18-й эмбриональный день к захвату внеклеточных моноаминов оценивали с помощью конфокальной микроскопии как живых клеток, так и фиксированных препаратов. Для этого тимоциты инкубировали с серотонином или с флуоресцирующим субстратом транспортеров моноаминов (ASP+) в присутствии или без селективного блокатора захвата серотонина (флюоксетина). Полученные данные подтверждают способность клеток эмбрионального тимуса активно захватывать серотонин.

Таким образом, в развивающемся тимусе плодов крыс присутствуют и функционально активны все компоненты серотонинергической системы, что подтверждает возможность прямого влияния серотонина на формирование тимуса. Существование локальной серотонинергической системы в эмбриональном тимусе, наряду с высоким уровнем серотонина в крови плодов, позволяет предположить различные функции внутритимического и циркулирующего пулов серотонина в регуляции развития тимуса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 16-04-01216 мол-а).

Ген *Answer*, утраченный в ходе эволюции у высших позвоночных, регулирует регенерацию и раннее развитие мозга у шпорцевой лягушки

Короткова Д.Д.^{1,2}, Иванова А.С.¹

¹ *Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.*

Овчинникова РАН, Москва

² *МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва*

ddkorotkova@gmail.com

Высшие позвоночные отличаются от низших пониженной способностью к регенерации конечностей и прогрессивным развитием переднего мозга. Согласно общепринятой точке зрения, эти особенности высших позвоночных являются результатом перестройки функциональных связей и первичных структур внутри приблизительно одного и того же набора генов. Мы предположили, что еще одной причиной вышеуказанных особенностей высших позвоночных могло быть исчезновение или появление у их предков отдельных важных генов.

В ходе работы на модельном объекте - шпорцевой лягушке *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) - мы исследовали экспрессию и функции одного из таких генов - *Answer* (от

Anamniotic specific wound epithelium receptor) тремя различными методами (гибридизация *in situ*, qRT-PCR, ингибирование функции *Answer* с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов). Ген *Answer* был идентифицирован ранее с помощью биоинформатического метода, позволяющего прицельно находить гены высших позвоночных исчезнувшие или приобретённые в ходе эволюции.

Нами было установлено, что ген *Answer* кодирует трансмембранный рецептор. С помощью метода qRT-PCR было показано, что экспрессия *Answer* активируется на ранних стадиях регенерации. Количество mRNA *Answer* резко возрастает в тканях культуры уже на первый день после ампутации. Экспрессия *Answer*, исследованная методом гибридации *in situ*, наблюдается преимущественно в раневом эпителии и бластеме. При этом блокирование трансляции мРНК *Answer* с помощью морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов приводит к подавлению регенерации. Подавление функции *Answer* приводит также к аномалиям развития головных структур. Последние данные хорошо согласуются с результатами исследования экспрессии *Answer* методом гибридации *in situ*, показавшими, что на стадии ранней нейрулы транскрипты данного гена локализованы в головной эктодерме эмбриона (в зачатке переднего мозга) и средней линии нервной пластинки.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ген *Answer* шпорцевой лягушки регулирует, как раннее развитие мозга, так и процесс регенерации придатков тела. В свою очередь, это подтверждает предположение, что исчезновение *Answer* у высших позвоночных действительно могло быть одной из причин снижения их регенерационных потенций и создать условия для дальнейших эволюционных изменений, приведших, в конечном итоге, к прогрессивному развитию мозга.

Выражаем благодарность научному руководителю Зарайскому А.Г. и Терёшиной М.Б.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ N 13-04-40194-Н КОМФИ.

Изучение морфофункциональных изменений в ооцитах свиней *in vitro*

Лопухов А.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика

Л.К.Эрнста, Россия, Подольск

vubi_myaso@mail.ru

Соматическое клонирование с использованием созревших *in vitro* ооцитов свиней имеет широкие перспективы применения в научных и медицинских исследованиях, а также в работах, направленных на создание животных с заданными свойствами. В большинстве случаев для получения цитопластов используют *in vitro* ооциты, окруженные тремя и более слоями кумулюсных клеток (КК), при этом большая часть ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) не используется. Кроме того, не определено влияние КК на качество ооцитов свиней, созревающих *in vitro*. Данная работа была направлена на исследование созревания, миграции первого полярного тельца (ППТ) и апоптоза в ооцитах свиней, созревающих *in vitro*, в зависимости от окружающих их слоев КК.

ОКК получали из яичников половозрелых свинок, после их убоя и разделяли на группы по количеству окружающих их слоев КК. К 1 группе относили ооциты, окруженные более чем 4 слоями КК, ко 2 – 3-4, к 3 – 1-2 слоями, к четвертой – 1 слоем или частично окруженные КК. Сформированные группы (по 25-30 клеток в каждой)

культивировали в модифицированной среде ТС 199 в течение 46 часов. После этого ОКК обрабатывали 0,1% раствором гиалуронидазы и удаляли прилегающие к ним КК. Норму ядерного созревания ооцитов определяли, как отношение числа ооцитов с ППТ к общему числу ооцитов, поставленных на созревание. Для анализа миграции ППТ (угол отклонения от метафазной пластинки) отобранные ооциты окрашивали Hoechst 33342 и оценивали в ультрафиолетовом свете. Уровень апоптоза в созревших ооцитах определяли методом TUNEL.

Доля созревания ооцитов в 1, 2 и 3 группах была равно выше, чем в 4 группе ($p < 0,05$) и составляла $96,5 \pm 1,9$, $81,6 \pm 6,5$, $83,5 \pm 2,2$ и $51,1 \pm 3,2$ %, соответственно. С другой стороны, не обнаружено влияния КК на характер миграции ППТ. Кроме того, среди ооцитов вне зависимости от группы после 46 часов созревания не было выявлено клеток с признаками апоптоза. Полученные данные позволяют рекомендовать при соматическом клонировании в качестве цитопластов использовать ооциты, окруженные не менее чем 1 слоем КК.

Влияние bFGF на дифференцировку клеток пигментного эпителия сетчатки *in vitro*

Малахова Е.В.

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра эмбриологии,

Россия, Москва

elenamallakhova@gmail.com

Пигментный эпителий сетчатки (РПЭ) - монослой клеток, расположенный между фоторецепторами и сосудами глаза, выполняющий жизненно-важную физиологическую функцию в сетчатке. В норме клетки РПЭ не пролиферируют, неподвижны и соединены друг с другом плотными контактами. В случае патологии, клетки РПЭ входят в клеточный цикл, меняют морфологию и приобретают подвижность. Это ведёт к нарушению структуры сетчатки и является причиной множества офтальмологических заболеваний.

Культивирование клеток РПЭ даёт возможность изучать эти патологические процессы. Известно, что клетки РПЭ способны дифференцироваться в мезенхимо- и нейрноподобные клетки.

Целью исследования было изучение действия bFGF (регулятора нейральной дифференцировки) на пролиферацию и пластичность клеток ARPE 19 (линейная культура РПЭ человека).

В эксперименте использовали клетки 3-4 пассажа. Количество сыворотки в среде понижали до 1% и в среду добавляли bFGF (20 нг/мл). Клетки инкубировали 24, 48 и 72 часа. Через 24 часа после воздействия клетки изменяли морфологию и форму колоний. Через 48 часов клетки приобретали эпителиальную морфологию, распластывались и выглядели более округлыми, по сравнению с вытянутыми клетками в контроле. Через 72 часа в культуре появлялись нейрноподобные клетки. Визуально отмечен более высокий уровень пролиферации.

Оценку пролиферации проводили на разных концентрациях клеток $8 \cdot 10^4$ кл/см², $4 \cdot 10^4$ кл/см², $2 \cdot 10^4$ кл/см², $1 \cdot 10^4$ кл/см², $0,5 \cdot 10^4$ кл/см², применяя МТТ-тест. bFGF увеличивал пролиферацию ARPE 19 при низкой концентрации клеток.

Нейральные маркеры оценивались иммуногистохимически и методом Real-time PCR. Иммуногистохимическими методами не выявлено значимого увеличения клеток с β - Tubulin III, в то время, как Connexin 43 экспрессировался постоянно на высоком уровне.

Более детальная характеристика экспрессируемых генов была осуществлена методом Real-time PCR. Были исследованы гены-маркеры РПЭ и нейральной дифференцировки. Исследование показало снижение экспрессии генов-маркеров РПЭ, но не обнаружило усиление нейральной дифференцировки.

Таким образом, bFGF усиливает пролиферацию, но не оказывает значимого нейрализирующего воздействия на клетки ARPE 19.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00604.

Влияние экзогенного 8-оксо-2'-дезоксигуанозина на рост и стационарное старение клеточной культуры

Мармий Н.В., Моргунова Г.В.

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва,
marmiynv@gmail.com*

8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) – один из наиболее популярных биомаркеров окислительного стресса, его содержание в ДНК увеличивается при старении, как организменном, так и клеточном, при ряде заболеваний, особенно воспалительных, и под действием стрессовых факторов. Однако в последние годы появились сведения о том, что 8-охо-dG после удаления из ДНК может играть роль биорегулятора, в том числе, оказывая противовоспалительное и антиаллергическое действие, а также увеличивая выживаемость клеток в неблагоприятных условиях культивирования. Мы предположили, что 8-охо-dG может активировать системы антиоксидантной защиты клетки и репарации ДНК без индукции окислительного стресса и провели серию экспериментов на культуре клеток для проверки этого предположения.

В экспериментах использовалась культура трансформированных клеток китайского хомячка линии B11-dii FAF28. Оценивали количество живых клеток в стареющей культуре, а также культуре после воздействия стрессовых факторов путем подсчета в камере Горяева. Кроме того, измеряли содержание 8-охо-dG в составе клеточной ДНК, в цитоплазме и в культуральной среде методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Также хроматографически оценивали изменения концентраций нескольких «ключевых» компонентов среды по мере роста культуры.

В результате, было выявлено влияние экзогенного 8-охо-dG на выживаемость клеток при голодании и стационарном старении, а также на кривую роста культуры. Показана зависимость этого эффекта от концентрации 8-охо-dG в культуральной среде (исследовался диапазон 10^{-6} - 10^{-3} М). Обнаружены изменения соотношения 8-охо-dG/dG в клеточной ДНК под влиянием экзогенного 8-охо-dG. Измерена кинетика поглощения 8-охо-dG из культуральной среды растущими и находящимися в стационарной фазе клетками. Выявлено изменение скоростей расходования ряда питательных компонентов среды под влиянием этого соединения. Изучен протекторный эффект 8-охо-dG при окислительном стрессе, вызванном кратковременным воздействием перекиси водорода.

Полученные данные свидетельствуют о том, что 8-охо-dG способен играть существенную роль в регуляции метаболических процессов клетки. Он не является просто «побочным продуктом» окислительного метаболизма, как было принято считать до недавнего времени, а, вероятно, участвует в запуске защитных систем клетки в ответ на окислительный стресс.

Особенности генетического репрограммирования дермальных фибробластов лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*) до плюрипотентного состояния

Мартынова Д.В.

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН,

Россия, Москва

dasha.martynova@mail.ru

В последние годы одной из глобальных задач, стоящих перед человечеством, стало сохранение биологического разнообразия Земли. По состоянию редких видов можно судить о качестве окружающей среды; сохранение каждого редкого вида означает восстановление его функций в экосистеме и реставрацию биоразнообразия в целом. Данная проблема будет принципиально решена, если для таких видов удастся получить плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), дающие гаметы – яйцеклетки и сперматозоиды, а затем, благодаря им, создать полноценный эмбрион. Клонирование вымирающих видов животных в настоящее время не дает положительного результата, более того является невыполнимым для большинства редких видов. В связи с этим, для попытки восстановления исчезающего вида белого носорога (*Ceratotherium simum*) была использована технология генетического репрограммирования соматических клеток. В России по данным международного союза охраны природы (IUCN) под критической угрозой исчезновения находится красный волк (*Cuon alpinus*) семейства Псовые, фенотипически близкий к лисам.

Известно, что при репрограммировании можно получить два типа индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) – т.н. naïve и primed – различающихся по потенциалу к дифференцировке. Однако остается неясным, является ли это общей закономерностью для ПСК млекопитающих или индивидуальной особенностью некоторых видов, а также, какие факторы влияют на установление различий между плюрипотентными клетками в ходе эмбриогенеза. В связи с этим нами была поставлена задача по изучению генетического репрограммирования дермальных фибробластов лисы (*Vulpes vulpes*) до плюрипотентного состояния и изучению факторов, влияющих на полноту репрограммирования. Для репрограммирования были использованы вирусные конструкции, несущие транскрипционные факторы плюрипотентности Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Репрограммирование проводили с использованием полностью охарактеризованных компонентов культуральной среды.

В результате исследований нами впервые в мире проведено генетическое репрограммирование соматических клеток лисы, и изучен статус полученных индивидуальных линий ИПСК. Показано, что условия репрограммирования (ростовые факторы, ингибиторные химические соединения, эпигенетические факторы) оказывают значительное влияние на конечное эпигенетическое состояние ИПСК. В дальнейших экспериментах планируется выяснить, какие условия репрограммирования приводят плюрипотентные клетки лисы к наивному состоянию.

Анализ наших данных, а также данных, полученных при репрограммировании соматических клеток собаки, позволит определить оптимальные условия и провести генетическое репрограммирование соматических клеток красного волка.

Автор выражает благодарность д.б.н., Лагарьковой Марии Андреевне за предоставленные культуры фибробластов.

**Влияние ретиноевой кислоты на ларвальный морфогенез полихеты
Platynereis dumerilii (Nereididae, Annelida)**

Миная Т.А.

*Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет,
Россия, Санкт-Петербург
tanye.m@gmail.com*

Ретиноевая кислота известна как морфоген, отвечающий, в частности, за передне-заднее паттернирование осевых структур в раннем развитии позвоночных животных. Ранее считалось, что классический сигналинг с участием ретиноевой кислоты и её ядерных рецепторов - эволюционное приобретение хордовых животных. Исследования последних лет выявили в геномах первичноротых животных из эволюционной ветви Lophotrochozoa ортологи большинства генов-участников этого сигнального пути (RAR, RXR, Cyp26, Aldh1a). Однако данных о влиянии ретиноевой кислоты на развитие первичноротых животных все еще очень мало.

Цель данной работы - изучение влияния экзогенной ретиноевой кислоты на морфологию личинок полихеты *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) и проверка гипотезы о её возможной роли в осевой спецификации у первичноротых животных из эволюционной ветви Lophotrochozoa.

В ходе эксперимента трохофоры *P. dumerilii* (в возрасте 24 часа после оплодотворения) инкубировали в течение суток в морской воде, содержащей ретиноевую кислоту в различных концентрациях (от 1мкМ до 10мкМ, с шагом в 1 мкМ). После этого личинки фиксировали и анализировали с применением иммуногистохимических методов. Также была проведена WMISH (Whole-Mount In Situ Hybridization) с РНК-зондом к Нох-гену *PduHox1*, который в норме интенсивно экспрессируется в нервных ганглиях первых двух хетоносных сегментов у личинок нереидных полихет.

В результате эксперимента были определены витальные концентрации ретиноевой кислоты, оказывающие влияние на морфологию личинок *P. dumerilii*. Морфометрическое исследование показало статистически достоверные изменения пропорций как всего тела личинки, так и относительных пропорций сегментов, по сравнению с контролем. В морфологии нервной системы также выявлены отличия, заключающиеся в разном уровне отхождения отростков от вентрального нервного ствола. Эти изменения носят градуальный, зависимый от концентрации ретиноевой кислоты характер. Результаты WMISH показали усиление транскрипции *PduHox1* в первом сегменте. Важно, что общие границы экспрессии гена остались в пространственных доменах, присущих нормальному развитию.

Таким образом, было показано наличие модулирующего эффекта экзогенной ретиноевой кислоты на личиночное развитие *P. dumerilii*, в частности, на осевую регионализацию. Это первые экспериментальные данные о влиянии ретиноидов на морфогенез полихет.

Проект поддержан Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант РФФИ № 14-04-01531 А).

Проявление клеточных биомаркеров возраста в модели "стационарного старения"

Моргунова Г.В., Мармий Н.В.

МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва

morgunova@mail.bio.msu.ru

В настоящее время ведется активный поиск биомаркеров старения, в том числе и клеточных, которые позволили бы быстро и просто определять момент, когда организмы/клетки можно считать достигшими определенного возраста – состарившимися. Довольно популярными маркерами на сегодняшний день являются проявление активности ассоциированной со старением бета-галактозидазы (SA- β -Gal) и накопление 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG) в ДНК. Мы оценили их применимость в рамках нашей модели "стационарного старения", т.е. увеличения вероятности гибели культивируемых клеток при замедлении скорости их пролиферации в пределах одного пассажа и при дальнейшем пребывании в стационарной фазе роста.

В работе использовали трансформированные клетки китайского хомячка линии B11-dii FAF28 (клон 237). Культуру инкубировали в течение 14–15 суток при 37°C в среде ДМЕМ с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. В первой серии экспериментов из клеток на 4-е, 8-е и 15-е сутки выделяли ДНК и оценивали количество 8-охо-dG и dG в гидролизате ДНК с помощью хроматографического анализа ("Beckman-Gold", США) при длине волны 254 нм. В другой серии на 7-е и 14-е сутки клетки фиксировали на 3–5 минут в 2%-ном формальдегиде и 0,2%-ном глутаральдегиде, после чего инкубировали с X-Gal в течение 12–16 часов при 37°C.

Оказалось, что отношение 8-охо-dG/dG увеличивается с "возрастом" культуры. На 15-е сутки, когда клетки переходят в фазу вымирания и начинают гибнуть, соотношение достоверно увеличилось ($22,40 \cdot 10^{-5}$) по сравнению с этим показателем на 4-е ($6,26 \cdot 10^{-5}$) и 8-е ($4,42 \cdot 10^{-5}$) сутки, когда клетки только достигли монослоя и перешли в стационарную фазу. Обнаружили также, что в 14-суточной культуре процент клеток, окрашивающихся на SA- β -Gal, гораздо выше, чем в "молодой" (7-суточной) контрольной культуре, где окраска практически отсутствовала.

Таким образом, в "стационарно старой" культуре клеток китайского хомячка действительно происходит накопление 8-охо-dG, о чем свидетельствует значительное увеличение отношения 8-охо-dG/dG перед началом вымирания клеток. Следовательно, можно предсказывать увеличение вероятности их гибели в культуре по проявлению этого маркера. Кроме того, в "старых" клетках проявляется окраска на SA- β -Gal, что демонстрирует хорошую корреляцию этого показателя с "возрастом" культуры. Мы полагаем, что оба метода можно использовать для определения биологического возраста клеток при тестировании новых веществ, обладающих потенциальной геропротекторной активностью.

Изучение экспрессии микро-РНК miR-335-5p, miR-203a, miR-204-5p в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях при самопроизвольном прерывании беременности в первом триместре

Омельчук Е.П.

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии,
Россия, Ростов-на-Дону
ekaterina.omelchuck@yandex.ru*

Согласованная работа генных каскадов в клетках матери и плода является решающим фактором при формировании системы мать-плацента-плод. До 60% повторных выкидышей вызваны пока не установленными факторами. Микро-РНК могут влиять на экспрессию генов непосредственно в клетках, либо участвуя в механизмах межклеточной сигнализации путем везикулярного переноса. Цель представленной работы – изучить экспрессию микро-РНК в материнской и фетальной ткани на ранних сроках беременности в норме и при самопроизвольном прерывании.

Биоинформационный анализ показал, что перспективными для дальнейшего изучения являются hsa-miR-335-5p, hsa-miR-203a и hsa-miR-204-5p. Образцы децидуальной, хорионической и эмбриональных тканей были получены на 5-9 неделе беременности после хирургического прерывания беременности (контрольная группа N=14) и после самопроизвольного прерывания беременности (исследуемая группа N=10). Из полученных образцов была произведена экстракция тотальной РНК, проведено полиаденилирование, реакция обратной транскрипции, и затем ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I. В качестве референсного гена был использован hsa-miR-92a-1-5p. Оценку изменения уровня экспрессии исследуемой микро-РНК в опытном образце по отношению к контрольному проводили с помощью 2-ΔΔСТ метода.

При невынашивании беременности по сравнению с нормально протекающей беременностью наблюдали достоверное снижение экспрессии hsa-miR-203a-3p в децидуальной и эмбриональной тканях. При сравнении экспрессии hsa-miR-203a-3p в децидуальной и эмбриональной тканях было выявлено достоверное изменение экспрессии как в контрольной, так и в исследуемой группах. Достоверного изменения экспрессии hsa-miR-204-5p и hsa-miR-335-5p во всех исследуемых тканях в норме и при невынашивании выявлено не было.

Полученные результаты показали, что снижение уровня экспрессии hsa-miR-203a-3p в децидуальной и эмбриональной тканях может быть ассоциировано с самопроизвольным прерыванием беременности в первом триместре. Причиной выявленной ассоциации может быть то, что данная микро-РНК влияет на экспрессию генов TNFA и MMP1, которые участвуют в контроле плацентации.

Исследование было выполнено при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ №6.98.2014/К.

Исследование структуры и функции GV ооцитов мышцы методами фемтосекундной лазерной нанохирургии, TOF-SIMS масс-спектрометрии, электронной и атомно-силовой микроскопии
Осыченко А.А., Гулин А.А., Шахов А.М.

*ИХФ РАН, Россия, Москва
alina.chemphys@gmail.com*

Для преовуляторных ооцитов, находящихся на стадии зародышевого пузырька (так называемых GV - germinal vesicle - ооцитов) млекопитающих характерно наличие крупных органелл, называемых «ядрышко-подобными тельцами» (ЯПТ). В ядрышках растущих GV ооцитов млекопитающих происходит синтез рибосомальной РНК и сборка рибосом, как и в соматических клетках. По мере остановки роста ооцитов и достижения ими своего финального размера синтез рРНК прекращается. В зрелых GV ооцитах формируется единое ядрышко, хорошо видимое в проходящем свете, имеющее размер около 10 мкм в диаметре. Считается, что это ядрышко транскрипционно не активно и не содержит ДНК.

Имеющиеся в настоящее время данные о функции и структуре ЯПТ не позволяют однозначно установить их роль в оогенезе и эмбриональном развитии млекопитающих. Утверждается, что при удалении ядрышек из GV ооцитов, которые находятся на стадии метафазы II, ооциты остаются способны к созреванию, оплодотворению и развитию *in vitro*, но только до двухклеточной стадии. Считается, что по структуре ЯПТ представляют собой однородное фибриллярное образование высокой плотности.

Основная проблема при исследовании структуры и функции ЯПТ ооцитов – это высокая инвазивность методов. Удаление ядрышко-подобного тельца при помощи микроиглы неизбежно влечет за собой повреждение мембраны клетки, захват части хроматина и цитоплазмы. Исследование структуры обычно производится с применением химической фиксации.

В данной работе функция ядрышко-подобного тельца исследовалась при помощи остросфокусированного фемтосекундного лазера, наносящего повреждения на субмикронном уровне. Эти повреждения практически не выходят за пределы фокального объема. Было показано, что при повреждении ЯПТ снижается способность ооцитов к развитию.

Впервые была показана неоднородная, гранулярная структура ядрышко-подобного тельца ооцитов методами электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии, TOF-SIMS масс-спектрометрии. При помощи метода TOF-SIMS масс-спектрометрии были получены уникальные изображения распределения ионов внутри ооцита. Таким образом, благодаря криофиксации образцов с последующей механической стабилизацией в эпоновой среде, были получены более точные данные о нативной структуре ЯПТ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-14-00856.

**Влияние гонадотропинов различной природы на рост и развитие
овариальных фолликулов *in vitro***

Паршина Е.А., Филатов М.А.

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра эмбриологии,
Россия, Москва*

lena_parshina5@mail.ru

Сохранение овариального резерва является одной из важнейших проблем современной репродуктологии. Существует несколько подходов к решению данной проблемы: криоконсервация ткани яичника с последующей реплантацией; культивирование овариальных фолликулов *in vitro*. Последний способ может оказаться единственно осуществимым для женщин, которым противопоказана гормональная стимуляция, например, в случае непроходимости маточных труб и гормонозависимых онкологических заболеваний. В данной работе мы разрабатывали именно технологию культивирования овариальных фолликулов.

Овариальные фолликулы культивировали в каплях альгинатного гидрогеля (0,75%) в среде α MEM с 10% содержанием сыворотки и добавлением L-карнитина, инсулин-трансферрин-селенита и гентамицина. Для стимуляции роста фолликулов в культуральную среду добавляли препараты гонал-ф (рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон человека) и фоллигон (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы) в концентрации 0,2 МЕ/мл. Так как фоллигон (в отличие от гонал-ф) обладает свойствами лютеинизирующего гормона и более выраженной фолликулостимулирующей активностью, была выдвинута гипотеза о том, что в среде с фоллигоном рост и созревание фолликулов будут происходить быстрее. Контрольную группу фолликулов культивировали без добавления гонадотропных гормонов.

После 6-ти суток культивирования фолликулы оставались жизнеспособными и сохраняли свою структуру, а при добавлении гормональных препаратов происходило значительное увеличение их размеров, также возрастало число клеток гранулезы и, в единичных фолликулах, было замечено формирование антральной полости. В ряде случаев происходил выход ооцита из фолликула (так называемая, «овуляция *in vitro*»).

Было обнаружено, что в зависимости от размера фолликулы по-разному отвечали на добавление гормонов в среду. Так, фолликулы диаметром до 140 мкм даже при добавлении гормонов росли медленно и достоверных различий между группами опыта и контроля обнаружено не было, а фолликулы диаметром свыше 140 мкм при гормональном воздействии достоверно увеличивали свою площадь в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$ непараметрический критерий Краскела-Уоллиса). Однако достоверных различий между двумя опытными группами обнаружено не было.

Таким образом, использованная нами система пригодна для культивирования овариальных фолликулов *in vitro*. В результате исследований были подобраны оптимальные начальные параметры и условия культивирования.

**Перераспределение хроматин-ремоделирующего белка ATRX в ядрах
двухклеточных эмбрионов мыши при искусственном подавлении
транскрипционной активности**

Сайлау Ж.К.

*Санкт-Петербургский государственный университет,
биологический факультет, кафедра эмбриологии, Россия, Санкт-Петербург
zhuldyz-official@mail.ru*

Белок ATRX участвует в процессах ремоделирования хроматина и относится к семейству SWI/SNF2 хроматин-ремоделирующих белков. Известно, что белок ATRX играет важную роль в поддержании стабильности генома в оогенезе и в процессах перестроек хроматина. Особенности внутриядерного распределения и функции белка ATRX изучали на соматических клетках млекопитающих, однако данные о взаимодействии ATRX с ядерными компонентами и его локализации в зависимости от транскрипционной активности в раннем эмбриогенезе мыши немногочисленны.

Целью настоящей работы являлось исследование особенностей внутриядерного распределения белка ATRX при искусственном подавлении транскрипционной активности в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши.

Исследовали эмбрионы мыши на поздней двухклеточной стадии дробления. К этому периоду развития завершаются процессы активации эмбрионального генома и достигается дефинитивный уровень транскрипционной активности хромосом. Для подавления транскрипционной активности были использованы ингибиторы транскрипции DRB (5,6-дихлоро-1-β-D-рибофуранозилбензимидазол) и актиномицин D. Ингибиторы добавляли в среду для культивирования эмбрионов. Были выделены 3 группы эмбрионов: контрольная группа и две группы эмбрионов, транскрипцию которых ингибировали с помощью актиномицина D (5 мкг/мл) или DRB (500 мкМ/мл). Выявление белка ATRX проводили с помощью непрямого иммунофлуоресцентного мечения с последующей конфокальной микроскопией.

Для всех трех изученных групп эмбрионов было характерно диффузное окрашивание нуклеоплазмы, на фоне которого выявляли участки большей концентрации ATRX, которые соответствовали областям гетерохроматина. В группе контрольных эмбрионов наблюдали области более интенсивного мечения дугообразной формы, которые были расположены непосредственно по периферии проядрышек, также участки сферической формы, располагавшиеся в нуклеоплазме независимо от проядрышек. В группе эмбрионов, которые культивировали с DRB, существенных отличий от описанной выше картины не наблюдали. Однако количество зон сферической формы оказалось больше, по сравнению с контрольной группой эмбрионов ($p \leq 0.05$). В третьей группе после подавления транскрипции с помощью актиномицина D наблюдали выраженные изменения общей картины ядра. Проядрышки имели удлиненную или неправильную форму (в норме проядрышки имеют сферическую форму). У большей части проядрышек периферия оказалась не меченной антителами к белку ATRX. Скопления белка ATRX в нуклеоплазме выявляли в меньшем количестве, чем в контрольной группе эмбрионов и группе эмбрионов, культивированных с добавлением DRB ($p \leq 0.01$).

Согласно полученным результатам, ингибирование транскрипции с помощью DRB не приводит к существенному перераспределению белка ATRX. Напротив, после использования актиномицина D локализация ATRX изменяется. Таким образом,

ингибиторы транскрипции с разным механизмом действия оказывают разные эффекты на характер локализации хроматин-ремоделирующего белка ATRX.

Научный руководитель: к. б. н., доцент И. О. Боголюбова

Исследование механизмов оседания и метаморфоза у *Gonothyraea loveni* (Hydrozoa)

Соколова Н.А., Паришина Е.А.

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

sok.natalie@gmail.com

Оседание личинок беспозвоночных является одной из причин морского обрастания. Поселяясь на поверхности гидротехнических сооружений, эти организмы наносят значительный экономический ущерб. В связи с этим изучение механизмов обрастания поможет найти пути решения этой проблемы.

Известно, что метаморфоз морских гидроидных полипов может быть индуцирован бактериями и одновалентными катионами (Li^+ , K^+ , Cs^+), которые способствуют открытию Ca^{2+} -каналов и активации протеинкиназы С. Целью нашей работы было исследование механизмов оседания на массовом гидроиде Белого моря *Gonothyraea loveni*.

Одновозрастные планулы получали инкубацией колоний со зрелыми гонангиями в темноте в течение ночи и последующей экспозицией на свету. Индукцию метаморфоза проводили раствором CsCl (116 мМ) в течение 5, 15, 30, 60 минут. Регистрацию морфологических изменений проводили через 1, 3, 6, 12 часов согласно следующей классификации: 1. планула; 2. планула, укороченная вдвое; 3. осевший «диск»; 4. образование верхушки роста; 5. полип. Для определения быстро метаморфизирующей области планулы были рассечены поперечно на anteriорную и posteriорную части. Для исследования роли щелевых контактов к раствору CsCl (116 мМ) добавляли блокаторы щелевых контактов (октанол 0,006%; карбеноксолон 100 и 10 мкМ).

Было выявлено, что 5 минут инкубации достаточно для индукции метаморфоза, но оптимальное время - 15 минут. Через 1 час количество изменивших форму и осевших планул во второй группе (15 мин индукции) было достоверно больше чем в первой (5 минут индукции). Окрашивание антителами к ацетилованному тубулину на 0 и ранней 3 стадиях показало, что количество ресничек на поверхности животного не уменьшалось при оседании. Следовательно, метаморфоз осуществлялся более сложными внутренними механизмами.

Показано, что под действием индуктора как anteriорная, так и posteriорная части планулы изменяли форму и оседали быстрее, чем в контроле. Но и в контроле, и в опыте по этим параметрам между собой anteriорный и posteriорный концы достоверно не различались. Интересно, что через 12 часов инкубации больше верхушек образовывалось на posteriорном конце. Мы связываем это с тем, что материал для образования верхушки изначально находился именно там.

Было показано, что блокаторы щелевых контактов не влияли на изменение формы планулы, но замедляли оседание: наиболее эффективным оказался 100 мкМ раствор карбеноксолона.

Таким образом, в настоящем исследовании была отработана методика индукции метаморфоза планул *G. loveni*, выявлена роль ресничек и щелевых контактов в механизмах оседания, а также разница в потенциях передней и задней частей планулы.

Показаны начальные этапы метаморфоза, определена часть планулы ответственная за образование верхушки.

**Взаимная гуморальная регуляция эндокринных источников норадреналина
в онтогенезе у крыс**

Сысоева А.П.

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Лаборатория нервных и нейроэндокринных регуляций
Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва
sysoeva.a.p@gmail.com*

Регуляция развития и функционирования организма в онтогенезе обеспечивается биологическими активными веществами, действующими в качестве морфогенетических факторов через рецепторы на клетки и органы мишени. Одним из таких веществ является норадреналин (НА), который секретируется в кровь хромаффинными клетками надпочечников и параганглиев (орган Цукеркандля - ОЦ), нейронами симпатической нервной системой и в отсутствие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) нейронами головного мозга. Нарушение метаболизма НА в критические периоды онтогенеза приводит у животных к нарушению развития сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а у человека – к развитию тяжелых врожденных заболеваний и повышает риск возникновения синдрома внезапной детской смерти.

Цель данной работы – изучение гуморальной взаимосвязи органов, секретирующих НА в общую систему циркуляции в онтогенезе до закрытия ГЭБ.

Для решения поставленных в данном исследовании задач оценивали секреторную активность (содержание НА) надпочечников и ОЦ при разрушении норадренергических нейронов мозга путем провоцирования их избирательной гибели введением в желудочки мозга неонатальных крысят гибридного молекулярного комплекса, состоящего из антител против дофамин-β-гидроксилазы (ДБГ), связанных с цитотоксином сапорином – анти-ДБГ-сапорин. Концентрацию НА в органах и плазме крови определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Показано, что через 48 часов после введения нейротоксина концентрация НА снижалась в плазме крови и в мозге, в то время как в надпочечниках и ОЦ концентрация НА не изменялась. Это означает, что через 48 часов нейротоксин избирательно разрушил норадренергические нейроны и не затронул синтез НА в других клетках. Проведенный иммуногистохимический анализ также подтвердил гибель нейронов в опытной группе животных, что дополнительно свидетельствовало о воздействии нейротоксина на норадренергические нейроны мозга. Через 72 часа после фармакологического выключения синтеза НА в мозге новорожденных крыс концентрация НА в плазме крови не изменялась, тогда как в надпочечниках она повышалась, а в ОЦ - снижалась.

Таким образом, на модели хронического выключения синтеза НА в мозге крыс в неонатальном периоде развития показано изменение секреторной активности периферических источников НА. Можно предположить, что секреция НА данными органами регулируется гуморально по принципу прямых и обратных связей.

Работа поддержана грантом РФФИ 14–15–01122.

**Изменение уровня ацетилирования гистонов
в процессе созревания ооцитов коровы *in vitro***

Шедова Е.Н.

*Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства
имени академика Л.К. Эрнста, Россия, Подольск
shedvek@yandex.ru*

Ацетилирование гистонов является важной эпигенетической модификацией, участвующей в регуляции организации хроматина и экспрессии генов в процессе мейотического созревания ооцитов. Срыв модификаций гистонов приводит к дефекту хромосомной конденсации и сегрегации, задержке развития и созревания яйцеклетки. Современные данные показывают, что картины гистоновых модификаций у млекопитающих, включая корову, значительно варьируют в зависимости от вида. Целью нашей работы являлось изучение изменения уровня ацетилирования гистонов в процессе созревания ооцитов коровы *in vitro*.

Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из яичников домашней коровы (*Bos taurus taurus*) после их убоя. Ооциты до (непосредственно после выделения из яичников) и через 24 часа созревания освобождали от клеток кумулюса и фиксировали в 4% параформальдегиде. Изменения уровня ацетилирования гистонов в ооцитах, на разных стадиях мейотического развития, определяли методом непрямого иммуофлюоресцентного окрашивания специфическими антителами в гистоне H3 по 9 лизину и в гистоне H4 по 12 лизину (AcH3K9 и AcH4K12 соответственно), антителами, направленными против ацетилированных лизиновых остатков. Для анализа иммуоцитологических препаратов использовали эпифлуоресцентный микроскоп Axio Imager M2 (Zeiss).

В результате иммуоцитохимического анализа были установлены различия в ацетилировании гистона 3 по 9 лизину (H3K9) и гистона 4 по 12 лизину (H4K12) в зависимости от стадии мейоза ооцитов коров. Высокая степень ацетилирования обоих гистонов, обнаружена на стадии зародышевого пузырька (ЗП) и стадии разрыва ЗП. Через 24 ч созревания ооцитов уровень ацетилирования гистона 4 по 12 лизину существенно снижался, а флуоресцентный сигнал, свидетельствующий об ацетилировании гистона 3 по 9 лизину, отсутствовал.

Таким образом процессы ацетилирования гистонов H3K9 и H4K12 в незрелых ооцитах коров происходят более активно, чем после завершения в них процесса созревания. Сделано предположение, что высокий уровень ацетилирования гистонов на стадии ЗП необходим для перехода на следующие стадии мейотического созревания ооцитов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект 15-08-99473).

**Иммортализация и исследование дифференцировочного потенциала
мезенхимных стволовых клеток**

Яппарова О.Н.

КФУ, ИФМиБ, Россия, Казань

lesenok1803@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются перспективным материалом для регенеративной медицины и тканевой инженерии. Однако ограниченная пролиферация и снижение дифференцировочного потенциала первичных МСК *in vitro* препятствуют проведению длительных лабораторных исследований.

Целью работы являлись иммортализация и исследование свойств иммортализованной линии мезенхимальных стволовых клеток человека.

В ходе работы была иммортализована линия мезенхимных стволовых клеток (иМСК) полученных из жировой ткани человека посредством подавления экспрессии гена *p53* и гиперэкспрессии каталитического компонента теломеразы человека (hTERT). Изменений в морфологии и кариотипе клеток обнаружено не было. Методом проточной цитофлуориметрии были показаны экспрессия типовых маркеров МСК, включая CD90, CD105 и CD73, и отсутствие экспрессии маркеров гемопоэтических клеток CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR. Тест на пролиферацию клеток показал, что время удвоения популяции иМСК *in vitro* было значительно ниже, чем у родительской линии клеток. Дифференцировка клеток была оценена на 10-33 пассажах. Клетки сохраняли потенциал к дифференцировке в хондрогенном, адипогенном и остеогенном направлениях, результаты не зависели от пассажа исследуемых клеток.

В результате выполненной работы была получена линия иМСК, обладающая высокой пролиферативной активностью и сохранившая потенциал к дифференцировке на поздних пассажах. Наши результаты свидетельствуют, что полученная клеточная линия может являться модельной для проведения фундаментальных исследований по изучению потенциала применения МСК в регенеративной медицине.

БИОФИЗИКА И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

Исследование действия наночастиц и миллиметровых волн на морфогенетические и биохимические потенции каллусных культур *Linum austriacum* L.

Арутюнян Арминэ Арменовна, Рштуни Лилим Робертовна

ГОУ ВПО Российско-Армянский (Славянский) Университет,

Республика Армения, Ереван

ami.chi@me.com

Растения синтезируют вторичные метаболиты, которые обладают широким спектром биологического действия и используются в терапии многих заболеваний. Среди вторичных метаболитов *L. austriacum* широкое применение имеют лигнаны, в частности подофиллотоксин и его менее токсичные полусинтетические производные. Альтернативными источниками получения биологически активных веществ растительного происхождения могут стать культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Целью работы является исследование действия наночастиц серебра и миллиметровых волн на морфологические, биохимические характеристики и биосинтетические потенции каллусных культур *L. austriacum*.

После предварительной селекции растений-доноров для инициации каллусной культуры нами были использованы семена наиболее продуктивных, с точки зрения накопления цитотоксических лигнанов, линий *L. austriacum*. Полученные культуры *L. austriacum* культивировали на питательной среде МС, содержащей БАП и α -НУК, при непрерывном освещении в климатическом шкафу (MRC PGL 550 Н, Израель) при комнатной температуре. Полученные нами недифференцированные, длительно-пассируемые пролиферирующие культуры *L. austriacum*, были использованы в качестве модельной системы для исследования механизмов действия наночастиц серебра («AgБион-2» Ag наноразмерное - 0,21 мг/см³ в ДСС) и физических факторов – миллиметровых волн (48,3; 50,0; 51,8 ГГц). Проводили ВЭЖХ анализ образцов, определяли активность пероксидазы.

Под влиянием миллиметровых волн увеличивается биомасса, усиливается фотосинтез каллусных культур *L. austriacum*, а при действии наночастиц повышается устойчивость к патогенам вследствие активации антиоксидантной системы, а также антисептической активности самих наночастиц. Воздействие высоких концентраций наночастиц приводит к изменению цвета культур льна с зеленого на серый или коричневатый. Исследованные нами факторы могут воздействовать различными механизмами, что отражается на синтезе подофиллотоксинов. Индуцируется биосинтез конечных продуктов лигнанов. Полученные результаты показывают, что, увеличение биосинтеза лигнанов хорошо коррелирует с возрастанием активности пероксидазы.

На основе полученных результатов, для исследования механизмов действия наночастиц серебра и миллиметровых волн, в качестве модельных систем можно использовать каллусные культуры *L. austriacum*. Это исследование направлено на выявление прикладного значения наночастиц как антисептических систем, также влияние миллиметровых волн на биосинтетические потенции. Это открывает новые просторы применения нанотехнологий и электромагнитных излучений в фармбиотехнологии.

Изучение накопления и биораспределения конъюгатов аминоксидного производного хлорина e_6 с бис(дикарболлид)кобальтом для задач БНЗТ

**Воловецкий А.Б.¹, Шилягина Н.Ю.¹, Дуденкова В.В.¹, Юшко Я.А.¹,
Брегадзе В.И.², Пасынкова С.О.², Феофанов А.В.³, Балалаева И.В.¹,
Масленникова А.В.¹**

¹Нижегородский Государственный Университет имени Н.И.Лобачевского,
Россия, Нижний Новгород

²Московский технологический университет, Институт тонких химических
технологий имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, Россия, Москва

Перспективным методом лучевой терапии онкологических заболеваний является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ), основанная на относительно избирательном накоплении в раковых клетках изотопа ^{10}B и его последующей активации потоком тепловых нейтронов. Ограничением для внедрения БНЗТ в клинику является отсутствие эффективных методов доставки бора в опухоль. Одним из перспективных направлений в этой области является использование конъюгатов порфиринов с наночастицей ^{10}B .

Исследование было выполнено на мышах линии Balb/c с привитой опухолью СТ-26. В рамках работы были изучены три соединения: конъюгат аминоксидного производного хлорина e_6 (длина линкера $n=6$) с бис(дикарболлид)кобальтом (I); конъюгат аминоксидного производного хлорина e_6 (длина линкера $n=8$) с бис(дикарболлид)кобальтом (II); аминоксидное производное хлорина e_6 (длина линкера $n=6$) (III). Данные соединения вводили в хвостовую вену животного. Через 3 часа после введения животных выводили из эксперимента и проводили анализ образцов тканей с использованием системы лазерной сканирующей микроскопии. Определяли средний уровень сигнала флуоресценции исследуемого соединения по площади изображений исследованных образцов опухоли и нормальных тканей животных. В качестве контроля использовали органы и ткани животного без введения препарата.

Первым этапом работы стал подбор дозы препарата, достаточной для его накопления в опухолевой ткани. Было проведено сравнение дозы 5 мг/кг веса и 10 мг/кг веса для соединения (I). Изучение образцов опухолевой ткани выявило появление в ней интенсивного сигнала флуоресценции при дозе 10 мг/кг и незначительное накопление при дозе 5 мг/кг. Далее все исследования проводили при введении соединений в дозе 10 мг/кг веса. Было проведено сравнение накопления и биораспределения соединений с различной длиной линкера (I) и (II). Отмечена значительная избирательность накопления, сравнимая для обоих соединений: высокий уровень был зарегистрирован в печени, почках, селезенке. Сигнал конъюгата в скелетных мышцах, гладкой мускулатуре и коже был существенно ниже. Характерной особенностью накопления флуорофоров в опухоли была неравномерность их распределения в различных участках. Количественный анализ уровня сигнала флуоресценции в образцах тканей показал незначительное различие в их накоплении: содержание конъюгатов в опухоли оказалось сравнимым между собой, а также с их содержанием в печени, а отношение сигнала флуоресценции опухоль/мышца составило ~ 3 .

Сравнение накопления и биораспределения соединений (I) и (III) продемонстрировало похожую избирательность соединений. Количественный анализ

уровня сигнала флуоресценции в образцах тканей показал, что соединение (III) обладает более интенсивным накоплением в печени, а содержание в опухолевой ткани сравнимо с соединением (I). Таким образом, конъюгаты хлорина еб с бис(дикарболлид)кобальтом продемонстрировали селективное накопление в опухоли, что показывает их перспективность как агентов для БНЗТ.

Цитотоксическая активность полимерной формы никлозамида в отношении опухолевых клеток различных линий

Жирник А.С., Крылов Н.И.

НИЦ «Курчатовский институт», Россия, Москва

as.zhirnik@mail.ru

Для пролонгирования действия, направленной доставки, а также для преодоления нежелательных физико-химических свойств противоопухолевых препаратов, например, плохой растворимости в воде, в настоящее время с помощью методов биотехнологии разрабатывают полимерные формы препаратов путем включения лекарств в биodeградируемые, биосовместимые полимеры. Полимерные препараты получают в виде наночастиц или частиц субмикронного размера. Показано, что препарат никлозамид, известный ранее только как антигельминтное средство, обладает высокой и избирательной цитотоксической активностью (ЦТА) в отношении опухолевых клеток различных линий. Целью работы было исследование активности полимерной формы никлозамида (ПФН) в сравнении с субстанцией никлозамида в отношении опухолевых клеток линии COLO 320 HSR (колоректальный рак человека), В16 (меланома мыши) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека).

ПФН готовили на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с добавлением вспомогательных компонентов. Частицы ПФН были получены и предоставлены нам сотрудниками НИЦ «Курчатовский институт» к.б.н., в.н.с. Воронцовым Е.А. и н.с. Кузнецовым С.Л. Выживаемость опухолевых клеток после действия субстанции никлозамида и ПФН оценивали с помощью МТТ-теста. По кривым выживаемости рассчитывали значения IC_{50} (концентрация препарата, при которой погибает 50% клеток).

Обнаружено, что ПФН обладает высокой ЦТА в отношении всех исследованных линий опухолевых клеток. Значение IC_{50} никлозамида для линий COLO 320 HSR, В16 и MCF-7 составило $2,1 \pm 0,2$; $2,1 \pm 0,3$ и $1,6 \pm 0,6$ мкМ соответственно, а для разных препаратов ПФН - $1,7 \pm 0,3$; $0,8 \pm 0,2$ и $3,1 \pm 0,9$ мкМ соответственно. В случае линий COLO 320 HSR и В16 обнаружена более высокая активность ПФН, чем субстанции никлозамида.

Таким образом, приготовленные на основе сополимера молочной и гликолевой кислот препараты ПФН обладают высокой ЦТА в отношении исследованных линий опухолевых клеток человека и мыши, что свидетельствует о необходимости исследования их противоопухолевой активности в экспериментах на животных.

Работа выполнена при поддержке ФЦП - соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0072; уникальный идентификатор проекта: RFMEFI60414X0072.

**Изучение влияния полиэлектролитов на ферментативную активность
алкогольдегидрогеназы, в связи с проблемой создания медицинских и
промышленных микродиагностикомов многоразового использования.**

Ким А.Л.¹, Мусин Е.В.¹, Дубровский А.В.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино
kimerzent@gmail.com

Целью работы является изучение каталитических свойств алкогольдегидрогеназы (АДГ) при ее взаимодействии с полиэлектролитами (ПЭ) в растворах с различной ионной силой. Данное исследование является новым витком развития технологии создания полиэлектролитных микрокапсул (ПМК) с инкапсулированными ферментами, которые станут достойной заменой нативных ферментов, в клинико-биохимической диагностике и мониторинге биотехнологического производства.

В рамках данной работы изучено влияние отрицательно заряженных полистиролсульфоната (ПСС) и декстрансульфата (ДС) и положительно заряженного полидиаллилдиметиламмония (ПДАДМА) на структуру и активность АДГ методами флуоресцентной и оптической спектроскопии.

Нами показано, что ДС и ПДАДМА не влияют на структурные и каталитические свойства фермента. ПСС за 1 ч инкубации незначительно снижал величину собственной флуоресценции белка, что связано с частичным разрушением его четвертичной структуры (глобулярности).

Изучение АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС показало, что активность фермента зависела как от времени инкубации, так и от влияния ПСС. Также было обнаружено, что в присутствии ПСС фермент инактивировался значительно сильнее, чем свободный, при этом соотношение полиэлектролита к белку не влияло на активность.

Ранее уже было показано, что моно- и дивалентные соли влияют на каталитические и структурные свойства комплекса лактатдегидрогеназы с ПСС, однако в нашем исследовании продемонстрировано, что добавление в реакционную смесь хлорида натрия (2 М и 0,2 М) или сульфата аммония (0,1 М) не уменьшало разрушающего действия ПСС на четвертичную структуру белка, но в то же время частично снимало негативное влияние ПСС на активность отдельных субъединиц, за счет предотвращения образования дисульфидных мостиков между сульфогидрильными (-SH) группами.

Изученные взаимодействия ПЭ с АДГ имеют принципиальное значение для развития технологии конструирования полиэлектролитных ферментных микродиагностикомов. Полученные данные расширяют список капсулируемых белков и дают возможность глубже понять механизмы их взаимодействия с полимерами.

Исследование антиоксидантной активности фуллеренолов в растворах модельных окислителей. Билюминесцентный мониторинг

Ковель Е.С.^{1,2}, Сачкова А.С.^{2,3}, Кудряшева Н.С.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Россия, Красноярск

²Институт биофизики СО РАН, Россия, Красноярск

³Томский политехнический университет, Россия, Томск

kkovel@yandex.ru

Фуллеренолы – это полигидроксилированные водорастворимые производные фуллеренов, перспективные для фармакологии. Актуальным является изучение их антиоксидантной активности.

Морские светящиеся бактерии и выделенные из них ферментативные системы являются удобными тестовыми объектами для мониторинга токсичности и биологической активности производных фуллеренов. Эти биотесты характеризуются высокой скоростью анализа, чувствительностью, возможностью приборной регистрации и количественной оценки токсичности. Регистрируемый параметр физиологической активности билюминесцентных тестов – интенсивность свечения. Для оценки клеточной и биохимической токсичности в работе были использованы две билюминесцентные тестовые системы: лиофилизированные бактерии *Photobacterium phosphoreum* и биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза–люцифераза. Кроме того, ферментативный биотест на был использован для прямого мониторинга эффективности ферментативных редокс-процессов.

Полигидроксилированный фуллерен $C_{60}O_y(OH)_x$ ($y=2-4$, $x=22-24$) и смесь фуллеренов ($C_{60}O_y(OH)_x$ и $C_{70}O_y(OH)_x$) были получены в ИФ СО РАН (Красноярск, Россия) и охарактеризованы по данным ИК и фотоэлектронной спектроскопии. В экспериментах использовали концентрации фуллеренола ($<10^{-4}$ г/л), не влияющие на интенсивность билюминесценции тестовых систем. Антиоксидантные свойства фуллеренолов были исследованы в модельных растворах органического и неорганического окислителей – 1,4-бензохинона и феррицианида калия, соответственно. Для характеристики токсичности растворов были выбраны эффективные концентрации окислителей, ингибирующие билюминесценцию на 50%, ($EC_{50}=2 \cdot 10^{-4}$ М и $EC_{50}=10^{-4}$ М для феррицианида и 1,4-бензохинона, соответственно).

Обнаружены сходства детоксикации растворов окислителей: (1) продемонстрирована активность низких концентраций фуллеренолов (10^{-17} - 10^{-4} и 10^{-17} - 10^{-5} г/л, соответственно для бактериальной и ферментативной систем), (2) детоксикация раствора органического окислителя была более эффективной, чем неорганического. Проанализированы скорости биохимических процессов в растворах окислитель+фуллеренол. Выявлено, что фуллеренолы (10^{-8} г/л) изменяют скорости эндогенных NADH-зависимых процессов: (1) ускоряют ферментативные NADH-зависимые реакции, стимулируя защитный отклик билюминесцентной ферментативной системы и/или (2) ускоряют автоокисление NADH, уменьшая восстановительные свойства среды и, следовательно, подавляя бактериальную люминесцентную физиологическую функцию.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №15-03-06786 и 15-43-04377-сибирь.

Изучение свойств производных хлорина e₆ для фотодинамической терапии Коростей Ю.С.^{1,2}

¹ *Московский Технологический Университет, Россия, Москва*

² *Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва
jkorostei@mail.ru*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) широко применяется для лечения различных злокачественных опухолей. Развитие метода ФДТ требует новых эффективных фотосенсибилизаторов. В данной работе были синтезированы новые амино-полиалкиламидные производные хлорина e₆ 1 и 2 и исследованы их свойства в качестве потенциальных агентов для ФДТ.

Исследования биологических свойств производных 1 и 2 были проведены на культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549. Для изучения внутриклеточного накопления использовали метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. При изучении фотоиндуцированной цитотоксичности использовали метод флуоресцентной микроскопии.

Было установлено, что производные 1 и 2 эффективно проникают в клетки A549, диффузно окрашивают цитоплазму и накапливаются в гранулярных структурах в цитоплазме. Для количественной оценки способности 1 и 2 проникать в клетки были измерены их коэффициенты накопления - максимальное отношение средней цитоплазматической концентрации к концентрации в инкубационной среде, которые оказались равными 113 ± 2 и 98 ± 1 для 1 и 2 соответственно. Было установлено, что облучение красным светом клеток, прединкубированных с 1 или 2, вызывает фотоиндуцированную концентрационно-зависимую гибель клеток. Определены концентрации соединений, вызывающие 50 и 90% гибель клеток (LD₅₀ и LD₉₀): LD₅₀ = 140 и 180 нМ; LD₉₀ = 200 и 300 нМ для 1 и 2 соответственно. Без облучения светом 1 и 2 не токсичны для клеток в исследованном диапазоне концентраций.

Таким образом, путем модификации структуры хлорина e₆, используемого в клинике фотосенсибилизатора, были получены новые производные 1 и 2. Фототоксичность производных 1 и 2 в отношении клеток A549 в десятки раз превосходит используемые в клинике фотосенсибилизаторы на основе хлорина e₆. Согласно полученным результатам производные 1 и 2 перспективны для ФДТ рака.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-03-00577, 13-04-00670.

Применение биофизических методов в изучении трансплантированных лишайников

Ле Тхи Бич Нгуэт, Бондаренко П. В., Абдуллин А. Ш.

*Московский физико-технический институт (государственный университет),
Россия, Долгопрудный
lenguyet5588@gmail.com*

Лишайники являются перспективными объектами в индикации качества окружающей среды. Изучение биофизических характеристик трансплантированных лишайников имеет большое общебиологическое значение для понимания основных

принципов биоиндикации и способности адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды.

Объектом исследования является эпифитный лишайник *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. Образцы талломов лишайника собраны 08.07.2014 г. с форофита *Ulmus glabra* Huds. на западном склоне широколиственного массива вдоль канала река Москвы города Долгопрудный Московской области (55°56'32.71" с.ш. 37°28'53.49" в.д.). Талломы лишайника были трансплантированы на двухметровой высоте в антропогенной зоне с интенсивной транспортной нагрузкой (55°55'22.57" с.ш. 37°31'44.15" в. д.) и в фоновой зоне (55°59'3.33" с.ш. 37°30'41.16" в. д.). Были проведены измерения основных параметров ЭПР-спектров методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и содержания металлов методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС) в талломах трансплантированных лишайников в течение четырех недель.

Результаты данной работы показали, что во всех образцах наблюдаются характерные ЭПР-спектры с двумя пиками: узкий пик со значениями g -фактора от 2,0032 до 2,0039 и широкий пик со значением g -фактора от 2,1056 до 2,1340. Количество парамагнитных центров (ПМЦ) в талломах лишайника фоновой зоны стабильно в трансплантационном периоде, тот же параметр талломов лишайника антропогенной зоны изменяется и достигается до максимального значения $((6,1 \pm 0,2) \times 10^{18}$ спин/мг) на третьей неделе эксперимента. Наблюдалось, что содержание меди в образцах лишайника антропогенной зоны увеличивается от $7,5 \pm 2,7$ до $56,4 \pm 8,6$ мкг/г за третью неделю трансплантации.

Известно, что количество ПМЦ является достоверной характеристикой состояния талломов лишайников. Негативные воздействия загрязнителей в атмосферном воздухе на талломы лишайника вызывают снижение содержания хлорофилла, деструкцию липидных мембран, нарушение работы электронного транспорта. Предположено, что увеличение количества ПМЦ широкого пика ЭПР-спектра в талломах лишайника антропогенной зоны за третью неделю трансплантации связано с влиянием меди на метаболизм талломов лишайника.

Перспективы прикладной цитомики с использованием ПАК NUCLEON на примере микроядерного тестирования для анализа данных о геномной нестабильности

Левицкая Ольга Сергеевна, Крылов Николай Валерьевич, Бодунков Николай Евгеньевич, Капырин Николай Игоревич, Соколов Александр Сергеевич

*Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева
Московский авиационный институт, Россия, Москва*

*Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва
olia_levits@mail.ru, rukorish@bk.ru, nikolay.kapyrin@gmail.com, boduncov63@hotmail.com,
alex.sokolov@gmail.com*

Технологическим ароморфозом в современной биологической науке являются методы получения и анализа больших данных, спровоцировавших развитие омиксных технологий на разных уровнях организации, таких как геномика, протеомика, метаболомика. Однако, огромный пласт ценных накопленных знаний в области цитологических исследований по сей день остаются недоступными для анализа, не смотря

на высокую ценность и надежность методик анализа и подсчета. Это связано с отсутствием стандартизированной аппаратной базы, надежно связанной с онлайн-ресурсами и недоступностью существующих, низкой скоростью и точностью человеческого анализа ввиду недоступности крупногабаритных автоматизированных установок.

Нами разработано устройство NUCLEON, являющееся автоматизированным микроскопом высокого разрешения со сверхточным позиционированием, системой искусственного зрения и интеллектуальной автономной фокусировки с подключением к wi-fi для аккумуляции данных в облаке. Так же разрабатывается архитектура сбора, хранения и анализа баз данных и интерфейсная структура вывода результатов анализов. Прибор разрабатывался специально для автоматизации микроядерного тестирования (АМЯТ) – метода, основанного на подсчете аномальных хромосомных шарообразных образований - микроядер, содержащихся в цитоплазме клеток, подвергшихся воздействию генотоксических средовых факторов (ионизирующего излучения, химические токсиканты, вирусные агенты и прочие).

Сканирование проводится с применением сменного позиционирования по оси Z в нескольких оптических срезах с последующей 3D реконструкцией клетки *in silico*. Такая методология в отличие от плоскостной автоматизированной микроскопии, проводимой с использованием дорогостоящих крупногабаритных установок с электромеханическим препаратоводителем, позволяет анализировать препараты с большим числом параметров, не уступая в размерности исследованию специалиста. Так как сегментированное изображение не дает представление об объектах, находящихся на изображении, производится процедура выделения связных областей и определение их формы. Форма также входит в состав описания ядра и клетки в виде набора инвариантных моментов.

АМЯТ позволяет производить мониторинг генетической токсичности и исследование явления геномной стабильности. Скорость и стоимость на 3 порядка превышает метод "ручного" подсчета, не уступая в точности. Простота АМЯТ позволяет работать с большими выборками в широком временном срезе. Для разработки алгоритмов интерпретации результатов анализа нами были проанализированы данные геронтологических, онкологических и генотоксических эффектов с применением мЯТ для человека и исследования геномной стабильности. Только один тест позволяет использовать NUCLEON для нужд превентивной токсикологии. Использование данного устройства открывает перспективы автоматизации иных цитометрических исследований.

Воздействие трития на фотолуминесценцию разряженного фотопротеина обелина

Луконина Анна Александровна¹, Петрова Алена Сергеевна²

¹Сибирский Федеральный Университет, ИФБиБТ, Россия, Красноярск

²Красноярский Государственный Аграрный Университет,

ИАЭТ, Россия, Красноярск

anyusi@mail.ru

Тритий является одним из самых распространенных продуктов распада радиоизотопов, использующихся в ядерной промышленности. Благодаря низкой энергии бета-распада, тритий является удобным объектом для изучения защитных реакций организма в условиях низких и средних доз облучения. Для изучения влияния трития на биологические системы выбран фотопротеин обелин, представитель группы голубых

флуоресцентных белков. К настоящему времени детально изучены закономерности изменения интенсивности и цвета люминесценции разряженного фотопротеина обелина под действием экзогенных нерадиоактивных соединений, что создает предпосылки для понимания процессов воздействия ионизирующего излучения на его люминесценцию. Изучение влияния низкодозового ионизирующего излучения на флуоресцентные характеристики разряженного обелина актуально с точки зрения выявления элементарных физико-химических и молекулярных механизмов откликов организмов на стрессовые воздействия.

Работа посвящена исследованию влияния низкодозового бета-излучения трития на фотолюминесценцию разряженного обелина. Белок инкубировали 216 часов при 5°C в присутствии тритиевой воды с активностью 200 МБк/л в Трис-НСl буфере при pH=7; измерения фотолюминесценции проводили каждые 24 часа при двух длинах волн возбуждения 350 и 280 нм. В качестве контроля использовали образец обелина без тритиевой воды.

Показано, что тритий подавляет общую интенсивность фотолюминесценции обелина. Спектры фотолюминесценции исходно включали пик с максимумом 410 нм. Однако при инкубировании с тритиевой водой появляется дополнительный максимум испускания в сине-зеленой области при 500 нм, интенсивность которого возрастает с увеличением времени облучения, в то время как интенсивность «фиолетового» пика (410 нм) падет.

Уменьшение интенсивности фотолюминесценции обелина объясняется денатурацией белка под воздействием трития, а изменение цвета люминесценции обелина с фиолетового до сине-зеленого – увеличением эффективности переноса протона в активном центре разряженного обелина, связанного вероятно с ионизацией и увеличением проводимости водной среды при бета-распаде трития. Полученные данные указывают на возможность создания принципиально нового люминесцентного биотеста с цветовой индикацией для мониторинга радиотоксичности и адаптивного отклика организмов.

Исследование цито- и генотоксического воздействия комплексов йодида кадмия, цинка с антипирином

Миронова Е.А.¹, Давыдова Г.А.¹, Рукк Н.С.², Скрябина А.Ю.²

*¹ Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН, Россия, Пущино*

*² Московский технологический университет
mironova_e27@rambler.ru*

Производные пиразолона, являясь нестероидными противовоспалительными препаратами, обладают анальгезирующим и противовоспалительным действиями. Эти препараты блокируют синтез простагландинов – веществ, являющихся медиаторами воспаления, а также обеспечивающих рост опухолевых клеток (ингибирование апоптоза и индукция образования кровеносных сосудов) - путём ингибирования фермента циклооксигеназы.

Комплексы антипирина (AP) с металлами являются перспективными для использования в биомедицине из-за их противоопухолевых свойств.

В Московском технологическом университете были синтезированы и охарактеризованы комплексы [Zn(AP)₂I₂], [Cd(AP)₂I₂], [Cd(AP)₄I₂], [Cd(AP)₆I₂]. В

Институте теоретической и экспериментальной биофизики были исследованы цито- и генотоксическое воздействие комплексов на фибробласты человека (HF) и клетки рака яичников (Caov4). Показано, что при концентрации соединений $1 \cdot 10^{-4}$ моль комплексы цинка и кадмия проявляют более выраженную цитотоксичность (выживаемость клеток в 30-40%). Для комплексов кадмия при их концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль токсичность уменьшается (для HF выживаемость составляет 50-70 %, а для клеток Caov4 40 – 60%). При концентрациях $10^{-6} - 10^{-7}$ М комплексы $[\text{Cd}(\text{AP})_2\text{I}_2]$, $[\text{Cd}(\text{AP})_4\text{I}_2]$, $[\text{Cd}(\text{AP})_6\text{I}_2]$ не токсичны. Комплекс $[\text{Zn}(\text{AP})_2\text{I}_2]$ не оказывает цитотоксическое воздействие на клетки при концентрациях $10^{-5} - 10^{-7}$ М. Антипирин не проявляет цитотоксичность во всем диапазоне концентраций.

Исследование генотоксического воздействия комплексов $[\text{Zn}(\text{AP})_2\text{I}_2]$, $[\text{Cd}(\text{AP})_2\text{I}_2]$, $[\text{Cd}(\text{AP})_4\text{I}_2]$, $[\text{Cd}(\text{AP})_6\text{I}_2]$, антипирина на клетки HF методом ДНК-комет показало концентрационнозависимое увеличение повреждения ДНК при воздействии комплексов (от 80 – 90% при концентрации 10^{-4} М до 3-5% при концентрациях $10^{-6} - 10^{-7}$ М). Антипирин не оказывал генотоксического воздействия.

Т.о. комплексы металлов с антипирином оказывают дозозависимое воздействие на клетки и проявляют свойства отличные от антипирина.

Кластерный анализ профилей физических свойств промоторов *E.coli*

Орлов М.А., Темлякова Е.А.

Институт биофизики клетки РАН, Россия, Пущино

orlovmikhailanat@gmail.com

Промоторные области бактериальной хромосомы расположены вблизи точки старта транскрипции (ТСТ) и регулируют процесс транскрипции за счет взаимодействия с РНК-полимеразой и транскрипционными факторами. В настоящее время для аннотирования вновь секвенированных геномов и ряда других задач необходимо располагать надежными способами предсказания положения промоторов. Для этого помимо текстового сходства консенсусных -10 и -35 последовательностей могут быть использованы характерные физические свойства промоторов, которыми они отличаются от непромоторных областей. К таким свойствам относят термостабильность, искривленность, способность деформироваться при взаимодействии с белками, вызванная суперспирализацией дестабилизация дуплекса ДНК (SIDD, Stress-Induced Duplex Destabilization) и др. (Wang, H.Q. and Benham, C.J., 2006). Они могут быть условно разделены на: 1) определяющиеся протяженными участками последовательности и равномерно проявляющиеся на их длине – *глобальные гладкие*; 2) определяющиеся протяженными участками, но проявляющиеся локально – *глобальные спайковые*; 3) определяющиеся и проявляющиеся локально – *локальные гладкие*.

В данной работе использованы последовательности экспериментально подтвержденных промоторов *E. coli* (штамм K12) из базы данных RegulonDB версии 8.5 (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>). Для них были рассчитаны электростатический потенциал (глобальная гладкая характеристика) на интервале $[-540, 180\text{\AA}]$, SIDD (глобальная спайковая характеристика) на интервале $[-1000, 1000 \text{ п.о.}]$ и энергия активации открытых состояний, рассчитанная с помощью модели динамики конформационных возмущений (локальная гладкая характеристика) (Grinevich A.A., et al, 2015) на интервале $[-100; 100 \text{ п.о.}]$ (все координаты приведены относительно ТСТ). Полученные данные подвергли

кластерному анализу (метод Уорда) с оценкой устойчивости методом совместной консенсусной кластеризации.

Установлено, что наибольшая устойчивость достигается при разбиении профилей на 4, 4 и 3 кластера соответственно. Около половины профилей SIDD лишены пиков, соответствующих вероятности плавления больше 50%, что позволяет предполагать отсутствие необходимости в них для функционирования значительной части промоторов. 3 из полученных для SIDD кластеров характеризуются пиками, локализованными в определенной части последовательности вблизи ТСТ. В случае 2 кластеров это участки, которые не могут напрямую взаимодействовать с РНК-полимеразой. По-видимому, подобные пики могут играть роль “предохранительных клапанов”, предотвращающих распространение волн суперспирализации вдоль ДНК. Это имеет регуляторное значение, поскольку промоторы могут быть чувствительны к этому параметру. Примечательно, что именно для этих 2 кластеров установлена статистически значимая обогащенность профилями с более высокими пиками. Интерпретация соотношения кластеров этих физических характеристик станет предметом дальнейшей работы.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-37-00303 мол_а.

**Формирование алгоритма модельно-экспериментальной задачи
воздействия гамма-излучения на вещество**

Пахомова Екатерина Александровна

Государственный университет «Дубна», Россия, Дубна

rad_biology@mail.ru

Изучение сложного объекта требует детальных исследований определенных сторон этого объекта, результаты которых затем следует состыковать для получения представления об объекте в целом. Целостное видение даёт масштабность задачи, результаты отдельных исследований – глубину, что важно для формирования научного мировоззрения. С точки зрения системного подхода мы имеем дело с распределенной системой, одним из основных свойств которой является возможное разбиение задач на блоки, решающие отдельные подзадачи, упорядочивание их выполнения, включая обмен данными, допуская параллельное выполнение части операций.

В применении к задачам биофизики речь может идти о стыковке эксперимента и модельных исследований, формировании единого алгоритма, что является целью данной работы. В качестве примера биофизической задачи рассмотрены элементы задачи репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК под воздействием ионизирующего гамма-излучения на вещество, описаны отдельные элементы экспериментальных и модельных исследований, которые состыкованы для цельного восприятия задачи.

Выделены следующие элементы экспериментальных исследований: выбор биологического объекта (клеточной культуры), работа с выборкой, предназначенной для облучения (подготовка к облучению, облучение клеток γ -лучами, подготовка и проведение иммуноцитохимического окрашивания), работа с контрольной, т.е. не подвергнувшейся облучению, выборкой (подготовка контрольных объектов, наблюдение за ними), сравнение облученных и контрольных (необлученных) выборок. Выделены следующие элементы модельных исследований: моделирование кинетики репарации, сравнение результатов моделирования и эксперимента. Отмечено, что достоверность модели должна определяться результатами эксперимента.

Предложен подход к адаптации аналитической модели общего вида к моделированию кинетики репарации ДР ДНК. Отмечены сложности реализации аналитического моделирования для реальных биологических объектов. Приведены примеры моделирования отечественных исследований, использующих большое количество нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений (11-17) и требующих применения численных методов, например, модифицированного алгоритма Левенберга-Марквардта, метода Рунге-Кутты четвертого порядка.

Рассмотренные элементы экспериментальной и модельной частей взаимоувязаны в единый алгоритм. Представляется, что данный алгоритм может быть полезен для формирования целостного научного мировоззрения в биофизических исследованиях.

Работа выполнена на базе Лаборатории радиационной биологии с использованием данных, полученных на установке Rocus-M Объединенного института ядерных исследований, г. Дубна.

Получение и исследование противоопухолевой активности полимерной формы этопозида в составе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот

Ратушняк М.Г., А.И. Муравьёва, Ю.П. Семочкина, В.Г. Перевозчикова

НИЦ Курчатовский институт, Россия, Москва

nrcki@nrcki.ru

При включении противоопухолевых препаратов в состав полимерных носителей субмикронного размера обнаружено повышение их активности и снижение неспецифической токсичности. Перспективными полимерами для получения лекарств в полимерной форме являются биосовместимые биodeградируемые сополимеры молочной и гликолевой кислот (полилактидгликолиды, PLGA), разрешенные в клинической практике.

В связи с этим целью работы явилось получение и исследование противоопухолевой активности полимерной формы этопозида (ПФЭ), полученной на основе полилактидгликолида с молярным соотношением мономерных звеньев 50 : 50 (PLGA 50/50), в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Для исследования цитотоксической активности ПФЭ в отношении различных клеток *in vitro* в сравнении со свободным этопозидом использовали пять линий опухолевых клеток и линию нормальных клеток человека. Выживаемость клеток после инкубации с препаратами оценивали с помощью МТТ-теста. Исследование противоопухолевой активности ПФЭ в сравнении с этопозидом *in vivo* проводили с использованием модели перевиваемого лимфолейкоза мыши линии Р388.

Получен и охарактеризован по составу и физико-химическим свойствам препарат ПФЭ. Показано, что ПФЭ обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека разных типов. Обнаружено, что ПФЭ обладает более высокой цитотоксической активностью, чем свободный этопозид, в отношении клеток линии K562^{ADR}, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью. При использовании модели перевиваемой солидной опухоли мышей линии Р388 показано, что ПФЭ обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo* и пролонгированным, по сравнению со свободным этопозидом, противоопухолевым действием.

Таким образом, как показано в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, ПФЭ обладает высокой противоопухолевой активностью и после проведения более широких доклинических исследований препарат ПФЭ может быть рекомендован для проведения клинических испытаний.

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии № 14.604.21.0072. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0072.

**Влияние гипоксии на состав мембранно-связанных белков
в человеческих эритроцитах**

**Светлана В. Сидоренко¹, Оксана Г. Лунева¹, Ольга О. Пономарчук^{1,2},
Артем М. Тверской¹, Наталия В. Алексеева¹, Леонид И. Деев¹,
Ричард Григорчик²**

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова

² Dept. of Medicine, University of Montreal, Canada

Кровеносные сосуды увеличивают диаметр в ответ на снижение парциального давления кислорода. Было установлено, что это функция изолированных сосудов реализуется только в условиях, когда перфузируемая жидкость содержит эритроциты.

Выброс АТФ из эритроцитов играет ключевую роль в вызванном гипоксией повышении тока крови в кровяном русле. Мы ранее показали, что гемолиз – является одним из возможных механизмов выброса АТФ из эритроцита, вызванный несколькими стимулами, включая гипоксию, но молекулярные механизмы увеличения хрупкости мембраны при гипоксии не изучены.

В этом исследовании мы сравнили действие гипоксии на уровень гемолиза, выброс АТФ и на состав мембранных белков в человеческих эритроцитах в условиях нормоксии/гипоксии.

Двадцати минутная инкубация человеческих эритроцитов в бескислородной среде увеличила содержание внеклеточного гемоглобина в ~1.5 раза ($p < 0.01$). Параллельные измерения значений свободного гемоглобина и содержания АТФ в образцах, показал положительную корреляцию между гемолизом и выбросом АТФ ($R=0.4639^2$; $p < 0.6811$), что подтверждает гемолитический механизм выброса АТФ. Сравнительный анализ 2D-электрофореза теней эритроцитов, полученных при гипоксии и нормоксии, показал двухкратное увеличение содержания мембранно-связанного белка с $M_w \sim 60$ кДа.

Таким образом, деоксигенация человеческих эритроцитов влияет на состав мембранных белков. Чтобы идентифицировать белок с $M_w 60$ кДа и его возможную роль в нарушении целостности эритроцитов в гипоксических условиях, необходимо выполнить дополнительные эксперименты.

Метод электроспиннинга для изготовления покрытий из фиброина шелка и желатина

Соколова Анастасия Ивановна¹, Боброва Мария Михайловна^{1,2},
Сафонова Любовь Александровна^{1,2}

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² ФГБУ Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов
имени академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва
nasty.sok@gmail.com, mariabobrova.msu@gmail.com, saf.lyubov.msu@gmail.com

Одна из задач тканевой инженерии - создание конструкций, имитирующих структуру органов и тканей. Структура таких конструкций соответствует архитектуре нативного внеклеточного матрикса органов, создавая благоприятную среду для культивирования клеток. Одним из современных методов получения конструкций является метод электроспиннинга, позволяющий получать конструкции, состоящие из микро- или нановолокон, имеющие значительную пористость и улучшенные физико-механические свойства.

Для исследования методом электроспиннинга были изготовлены покрытия из фиброина шелка *Bombyx mori* и желатина, а также трех композитов с различным соотношением фиброина и желатина по массе: 1:3, 1:1 и 3:1. Для изготовления покрытий использовали растворы полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол-2 с общей концентрацией белка 75 мг/мл.

Установка для изготовления покрытий состояла из насоса, тупоконечной иглы, соединенной с источником высокого напряжения и коллектора. Были подобраны оптимальные параметры установки: расположение насоса под углом 45° к плоскости опоры, расстояние между коллектором и концом иглы, равное 3 см, а также параметры получения волокон – напряжение источника тока и скорость подачи раствора. Методами микроскопии была подтверждена пористая структура покрытий, состоящих из равномерно распределенных волокон, уложенных в несколько слоев. Анализ адгезии и пролиферации клеток проводили на примере фибробластов мыши линии 3Т3. Адгезия клеток была зарегистрирована на всех покрытиях, на 3 день эксперимента существенных различий в пролиферации клеток на различных покрытиях выявлено не было. На 5ый день эксперимента было продемонстрировано увеличение количества клеток на покрытиях с соотношением фиброина и желатина 1:3 и 1:1 по сравнению с остальными покрытиями. Более того, на покрытиях с соотношением фиброина и желатина 1:3 было выявлено наибольшее количество клеток: в 2,5 раза больше, чем на покрытиях из желатина, и в 6 раз больше, чем на покрытиях из фиброина шелка.

Метод электроспиннинга позволяет получать многослойные пористые конструкции из различных полимеров и их композитов. Полученные конструкции эффективно поддерживают адгезию клеток, создают благоприятную среду для их пролиферации. Покрытия, полученные из раствора фиброина шелка с желатином в массовом соотношении 1:3 в наибольшей степени способствуют пролиферации мышинных фибробластов 3Т3.

**Разработка новых полимерных субмикронных форм металлопорфиринов
для высокоэффективной доставки в опухолевые клетки**

Фаустова М. Р.¹, Жунина О.А.², Моллаев М.Д.², Никольская Е.Д.²

¹Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Москва

²АНО "Институт молекулярной диагностики", Москва
phaustova112@yandex.ru

Известно, что механизм действия металлопорфиринов (MeP) основан на генерировании активных форм кислорода (АФК), что приводит к повреждению клеточных белков, ДНК и мембран. Однако применение MeP в качестве противоопухолевого агента сопряжено с такими проблемами, как высокая токсичность, отсутствие пролонгированного действия и множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к данному веществу. В связи с этим, актуальным научным направлением представляется разработка полимерных субмикронных форм MeP, позволяющих добиться требуемого результата, минуя вышеуказанные проблемы.

Таким образом, методом одинарного эмульгирования были получены полимерные формы комплекса железа (III) с тетрафенилпорфирином на основе полимера PLGA 5004 с варьированием различных параметров, таких как гомогенизация, концентрация стабилизатора эмульсии и тд.

Было установлено, что размер полимерных капсул, содержащих комплекс железа (III) с тетрафенилпорфирином, находился в пределах от 250 до 750 нм. Следует отметить, что заявленному требованию (не более 300 нм) соответствовала только та полимерная форма, для получения которой использовали 1% поливиниловый спирт (ПВС) в качестве стабилизатора эмульсии, и ее размер составил 250-280 нм. Дзета-потенциал всех полимерных форм с MeP составлял от -25 до -8.95 мВ, что способствует лучшей диффузии в опухолевые клетки. Определение общего содержания комплекса железа (III) с тетрафенилпорфирином и его содержание внутри полимерных носителей (степень включения) проводили спектрофотометрическим методом с последующим математическим расчетом.

Полимерные частицы, обладающие наименьшим размером (250-280 нм) также имели самую большую степень включения вещества – 74%, при этом общее содержание MeP было 6.5%. Данные частицы были исследованы *in vitro* для определения противоопухолевой активности комплекса железа (III) с тетрафенилпорфирином в отношении клеток рака шейки матки линии HeLa.

В процессе исследования было установлено, что оптимальным стабилизатором эмульсии для включения данного MeP является 1% ПВС; оптимальное массовое соотношение вещества к полимеру 1:5; оптимальное объемное соотношение водной и органической фаз 5:1. Результаты исследования цитотоксической активности полученных частиц показали увеличение эффективности полимерной формы MeP в 2.6 раза в сравнении со свободным MeP. Таким образом, включение MeP в полимерную капсулу приводит к повышению его цитотоксической активности, из чего можно предположить о высокой противоопухолевой эффективности данной полимерной формы MeP в испытаниях *in vivo*.

**Влияние двухвалентных катионов на вызванные светом электрические
ответы глаза моллюска *Lymnaea stagnalis***

Федоренко Александр Дмитриевич

*Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Россия, Калининград
atens39@yandex.ru*

До сих пор остается неясным основной принцип передачи зрительного сигнала от фоторецепторов сетчатки брюхоногих моллюсков в центральные ганглии. Рассматривается как прямой путь, когда аксоны фоторецепторов входят в состав оптического нерва, так и передача через обнаруживаемые в сетчатке клетки второго порядка. Прояснению этого вопроса могут помочь исследования влияния на вызванные светом электрические сигналы глаза двухвалентных катионов, среди которых Ca^{2+} является непосредственным участником передачи сигнала в химических синапсах, а Mg^{2+} и Mn^{2+} известны как блокаторы выделения медиатора.

В ответ на освещение глаза моллюска *Lymnaea stagnalis* регистрируют два вида электрических сигналов: медленные волны электроретинограммы (ЭРГ) и импульсную активность. ЭРГ, по-видимому, представляют собой суммарное выражение деполяризационных рецепторных потенциалов клеток сетчатки. Импульсная активность состоит из потенциалов действия нервных волокон, входящих в состав оптического нерва.

Эксперименты с безкальциевым раствором, содержащим Mg^{2+} до 15 мМ, не дали однозначного результата: наблюдали как уменьшение, так и увеличение амплитуды ЭРГ, при этом импульсный компонент ответа всегда присутствовал.

Удаление из раствора Ca^{2+} и Mg^{2+} приводило к частичному уменьшению амплитуды ЭРГ без подавления импульсного ответа. Существенное подавление обоих видов электрических сигналов наблюдали при введении в раствор 1 – 4 мМ ЭДТА- 2Na^+ или 10 мМ Mn^{2+} .

Проведенные исследования позволяют утверждать, что электрический ответ, регистрируемый в оптическом нерве *L. stagnalis* на освещение глаза, в основном сформирован импульсной активностью фоторецепторов, аксоны которых идут в церебральные ганглии. Наряду с этим можно предполагать наличие синаптических связей между фоторецепторами сетчатки, а также возможность передачи небольшой части сигналов в оптический нерв через клетки второго порядка. Можно предполагать вовлечение ионов Ca^{2+} , а возможно и Mg^{2+} в механизм преобразования светового сигнала в фоторецепторах моллюска. Блокирующее действие Mn^{2+} на световые ответы, по-видимому, связано с нарушением механизма фототрансдукции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-08788).

**Эволюция метастабильных состояний при образовании комплекса
электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома f**

Федоров В.А.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра биофизики, Россия, Москва
xbgth@yandex.ru*

Короткоживущие белок–белковые комплексы играют важную роль в различных процессах, протекающих в живой клетке. Формирование короткоживущих комплексов

происходит при активации и ингибировании ферментативной активности, в процессе рецепции и передачи информации, при окислительно-восстановительных реакциях и др. В данной работе на основе вычислительного эксперимента проводится реконструкция процесса сближения молекул белков и идентификация промежуточных (метастабильных) состояний с использованием методов броуновской и молекулярной динамики и иерархического кластерного анализа.

Методом броуновской динамики получено множество электростатически выгодных взаимных пространственных положений белков, при которых возможен диффузионный захват одного белка другим белком. Методом кластерного анализа выявлены наиболее типичные структуры таких диффузионно-столкновительных комплексов.

С использованием метода молекулярной динамики были найдены возможные пути эволюции таких комплексов. В качестве начальных состояний были выбраны два наиболее типичных энергетически выгодных диффузионно-столкновительных комплекса пластоцианина и цитохрома *f* с энергией электростатического притяжения между молекулами более 8kT. Для каждого из этих комплексов были проведены расчеты молекулярной динамики в явно заданном растворителе. Были выявлены потенциально продуктивное (способное переходить в функционально активное) и непродуктивное (не являющееся функционально активным и не изменяющееся со временем) метастабильные состояния. Оба состояния являются энергетически выгодными. Белки из продуктивного начального состояния за время порядка 400 нс. образовали финальный комплекс в процессе молекулярно-динамического расчета, в то время как белки из непродуктивного начального состояния не образовали финальный комплекс за время более микросекунды, а, напротив, продолжают находиться в непродуктивном состоянии. Таким образом, образующиеся в процессе формирования функционально-активного комплекса метастабильные состояния либо быстро эволюционируют к финальному комплексу, либо остаются практически неизменными, по крайней мере за время вычислительного эксперимента. Такие непродуктивные метастабильные состояния впоследствии могут быть разрушены благодаря действию случайной броуновской силы.

Выражаю благодарность своим научным руководителям Коваленко И.Б. и Хрущеву С.С. Работа выполнена с использованием ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа поддержана грантами РФФИ № 15-07-08927, № 14-04-00302 и № 15-04-08681.

Система доставки противоопухолевого бактериального фермента биназы на основе нанотрубок галлуазита

***Ходжаева Вера Сергеевна, Ульянова В.В., Макеева А.В., Зеленихин П.В.,
Фахруллин Р.Ф.***

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Россия, Казань
khojaewa.vera@mail.ru*

На сегодняшний день ученые уделяют пристальное внимание поиску новых эффективных систем доставки лекарственных веществ в организм человека. Актуально использование различных наноконструкций в качестве носителей таких препаратов. В данной работе мы использовали нанотрубки галлуазита (ГНТ) для загрузки в них

бактериального фермента – рибонуклеазы (РНказы) *Bacillus pumilus* – биназы. Биназа обладает противоопухолевым, селективным цитотоксическим действием, фермент нечувствителен к ингибитору РНКаз млекопитающих, в связи с этим биназу можно рассматривать как альтернативный противоопухолевый препарат нового поколения.

Экспериментальным путем мы установили, что подходящим раствором для загрузки биназы внутрь ГНТ является вода pH 5.5, при этом иммобилизация фермента составляет почти 90%, что подтверждалось результатами анализа концентрации белка в суспензии и каталитической активности фермента. Для выхода фермента наружу использовали натрий фосфатный буфер pH 7.0, что соответствует pH физиологических жидкостей организма.

Колориметрический тест для оценки жизнеспособности клеток с использованием реагента WST in vitro выполнялось на стандартных опухолевых клеточных линиях Colo 320 HSR (карцинома сигмовидной кишки человека). Анализ показал, что добавление пустых ГНТ в количестве 65 мкг на каждые 800 тыс. клеток в лунке не приводит к их гибели, в то время как добавление ГНТ, загруженных биназой (в концентрации 100 мкг/мл), вызывает гибель клеток. Для сравнения были использованы ГНТ, загруженные сывороточным альбумином (100 мкг/мл), которые также не вызывали токсического эффекта. Следует отметить, что сам по себе альбумин не обладал цитотоксической активностью по отношению к анализируемым клеткам.

Ранние исследования по изучению токсичности ГНТ, проведенные на клетках микроорганизмов, нематод, человека, показывают их биосовместимость. Применение нанотрубок галлуазита в качестве наноконтейнера обеспечит возможность их использования для целевой доставки противоопухолевого препарата на основе бактериального фермента биназы непосредственно к пораженным клеткам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-07864 а.

**Оценка токсичности химических соединений и наночастиц в отношении
Paramecium caudatum с помощью улучшенной тест-системы**

Шевцова Юлия Александровна, Свиридова Ирина Андреевна

Волгоградский государственный университет, ВолГУ,

институт естественных наук, Россия, Волгоград

milliner2013@yandex.ru

Различные гидробионты и почвенные эукариотические организмы широко используются в оценке экологической безопасности различных химических продуктов и материалов, которые могут поступать в окружающую среду в результате деятельности человека. Одним из широко используемых объектов являются инфузории *Paramecium caudatum* [1]. Основными проблемами использования инфузорий являются сложности стандартизации метода и сложности в сравнении результатов тестирования по различными протоколам. Целью работы была разработка рабочего протокола теста на экотоксичность, доступного для рутинного использования практически в любой лаборатории и характеризующегося низкими трудоемкостью и стоимостью анализа в сочетании с улучшенной воспроизводимостью и робастностью.

В ходе работы был разработан и оптимизирован рабочий протокол, позволяющий оценивать токсичность химических соединений и материалов по отношению к

P. caudatum. Анализ применим практически к любым химическим соединениям (органические и неорганические вещества, гидрофильные и липофильные соединения), а также к наночастицам. Метод отличается низкой стоимостью, не требует каких-либо специальных или дорогостоящих приборов и инструментов и может быть воспроизведен в любой минимально оборудованной лаборатории. Для оценки токсического воздействия использовали два различных показателя: подвижность инфузорий и их гибель. Анализ может быть адаптирован для оценки как острого, так и хронического (до нескольких суток) воздействия проверяемых соединений/наночастиц.

Разработанный протокол был апробирован с использованием различных химических соединений и металло-содержащих наночастиц. В частности, был проведен сравнительный анализ токсичности Ag^+ (в форме нитрата) и серебряных наночастиц (AgNPs), полученных различными способами. Показано, что AgNP обладают более слабой токсичностью, чем раствор нитрата серебра. В то же время, эффекты AgNP на подвижность и выживаемость инфузорий существенно отличаются в зависимости от использованного для их получения восстановителя, от соотношения концентраций восстановителя и Ag^+ и от размера частиц после фракционирования.

В результате работы разработан рабочий протокол доступного и недорогого теста на экотоксичность с использованием инфузорий и проверена его применимость на широком спектре вероятных токсикантов.

**Температурозависимое изменение плотности рецептора
ErbB2 на поверхности клеток SK-BR-3 в ответ на специфическое связывание
фототоксина DARPIn-miniSOG**

Шилова Ольга Николаевна

ФГБУН Институт биоорганической химии

имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

olga.shilova.n@gmail.com

Изучение интернализации клеточных рецепторов в ответ на естественные лиганды или агенты таргетной терапии имеет значительное прикладное значение, так как динамика интернализации комплекса с рецептором может влиять на эффективность работы адресных токсинов и флуорофоров. В данной работе рассматривается влияние температуры на интернализацию комплекса адресного токсина DARPIn-miniSOG и рецептора ErbB2 (HER2), одного из ключевых маркеров рака молочной железы и мишени для терапевтических антител, а также оценивается скорость рециклизации рецептора после интернализации.

Для оценки скорости интернализации и рециклизации ErbB2 использовались флуоресцентные свойства самого токсического модуля miniSOG, которые он теряет при попадании в кислую среду эндосом. Уникальные свойства этого белкового модуля позволили нам детектировать связывание адресного токсина с клетками SK-BR-3 и его попадание в эндосомы при помощи проточной цитофлуориметрии.

Нами было показано специфичное связывание DARPIn-miniSOG с рецептором ErbB2 на поверхности клеток. При инкубации обработанных белком клеток при температуре 4°C за час не происходит значимого снижения уровня окрашивания. Однако при повышении температуры снижение сигнала флуоресценции наблюдается уже в первые 10 минут, что свидетельствует об интернализации комплекса рецептора с

токсином. При этом степень падения сигнала также зависела от температуры: наибольшее изменение флуоресценции наблюдалось при возвращении клеток к физиологической температуре. При инкубации 37°C в течение часа уровень окрашивания снижается приблизительно вдвое. После такой интернализации количество рецептора на мембране уменьшается, однако возвращается к исходному за 12 часов. При этом восстановление количества ErbB2 на поверхности клеток после их обработки папаином происходит через 72 часа.

Таким образом, можно заключить, что при физиологической температуре происходит медленная интернализация комплекса DARPIn-miniSOG и ErbB2. При охлаждении клеток и последующем возвращении к температуре 37°C происходит ускоренная интернализация данного комплекса путем эндоцитоза, после которой рецептор возвращается на мембрану в течение 12 часов в результате рециклизации.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-00859.

**Антиагрегационное Действие Липосомальной Формы липоевой кислоты.
Щелконогов В.А.^{1,2}, Сорокоумова Г.М.¹, Баранова О.А.², Чеканов А.В.², Бабушкин
А.В.², Клочкова А.В.²**

¹Московский технологический университет (кампус МИТХТ), Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет

имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

vasiliy9999@yandex.ru

Сосудистые заболевания головного мозга относятся к числу наиболее распространенных форм патологии центральной нервной системы. Основные патогенетические механизмы инсульта включают в себя: снижение мозгового кровотока, возникновение и прогрессирование окислительного стресса; воспалительные реакции, повреждения ГЭБ и др. Комплексная терапия данной патологии включает применение препаратов, проявляющих антиоксидантное и антитромбоцитарное действие. Такими свойствами обладает альфа-липовая кислота (ЛК).

Целью данной работы является создание новой лекарственной (липосомальной) формы ЛК, которая обладает пролонгированным действием и влияет на агрегацию тромбоцитов (Тц).

В ходе работы липосомы получали методом экструзии. Количество ЛК, инкапсулируемой в липосомы, определяли спектрофотометрическим методом. Влияние липосомальной формы ЛК на агрегацию Тц проводили с использованием агрегометра (Helena Laboratories AggRam, USA). Размеры частиц определяли турбидиметрическим методом и методом динамического светорассеивания (DelsaNano C Beckman Coulter, USA).

В результате работы были подобраны оптимальные условия для получения липосомальной формы ЛК (d=210 нм), которая имеет эффективность включения ЛК в липосомы равную 85%, обладает пролонгированным действием и стабильной при хранении в течение 6 месяцев (при T=4°C).

Показано, что «пустые» липосомы на 30 % уменьшают агрегацию Тц, вызванную индуктором арахидоновой кислотой, а липосомы с ЛК (C = 500µM) ингибируют на 80 % агрегацию тромбоцитов, обусловленную этим индуктором, что близко по действию водорастворимой формы ЛК (этилендиаминовая соль ЛК).

Было установлено, что липосомы, содержащие ЛК (С = 500, 800 и 1000 μ М), ингибируют агрегацию тромбоцитов на 30, 40 и 45 % соответственно, как в плазме крови здоровых доноров, так и плазме крови пациентов с острой недостаточностью мозгового кровообращения (ОНМК), вызванную индукторами агрегации Тц ристомицином и коллагеном. Кроме того, было выявлено, что «пустые» липосомы в количестве 2 мМ уменьшают агрегацию Тц, на 40%, в то время как водорастворимая форма ЛК (С = 500,800 и 1000 μ М) незначительно (на 10%) уменьшает агрегацию Тц, вызванную этими индукторами.

Можно предположить, что липосомы с ЛК, проникая через гематоэнцефалический барьер, будут эффективно подавлять агрегацию тромбоцитов в сосудах головного мозга и снижать риск развития ОНМК.

БИОХИМИЯ

Релокализация шаперонов в ответ на смену источника углерода и осмотический стресс у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Бабенко И.В., Александров А.И.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биохимии имени А.Н. Баха

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

Россия, Москва

alexvir@inbi.ras.ru

Живые клетки – это сложные системы, которые динамично реагируют на изменение внешних условий и различные стрессы. Шаперонный аппарат является ключевым компонентом клетки, который предотвращает необратимое повреждение белков и тем самым позволяет клетке пережить стрессовое воздействие. Целью работы было обнаружение и изучение неправильного сворачивания белков в ответ на осмотический стресс. С помощью микроскопии клеток, содержащих шапероны, меченные зеленым флуоресцентным белком GFP, было обнаружено, что при осмотическом стрессе шаперон Hsp104, а также шапероны Ssa1 и Ssa2 (Hsp70) и Ydj1 (Hsp40), образуют множество мелких скоплений, причем эти скопления возникают только при стрессе клеток, растущих на среде с несбраживаемыми источниками углерода, то есть в условиях активной работы митохондрий. Природа данных скоплений не ясна, однако скорость их возникновения и исчезновения может указывать на то, что они возникают в результате связывания шаперонов с пока не идентифицированными клеточными органеллами.

Показано, что в отсутствие осмотического стресса в клетках, растущих на среде с несбраживаемыми источниками углерода, образуются крупные скопления шаперона Ssa1 (Hsp70), меченого GFP. Эти скопления, по всей видимости, представляют собой либо агрегаты неправильно свернутого белка Ssa1-GFP, либо комплексы неизвестных белков с этим шапероном. Получены данные, свидетельствующие о том, что в формировании скоплений Ssa1-GFP участвует тубулиновый цитоскелет, а их разборка осуществляется шапероном Hsp104. Можно предположить, что при данных условиях культивирования Ssa1-GFP накапливается в клетках в местах отложения неправильно свернутых белков, например, в так называемых агресомах или IPOD (insoluble protein deposit – сайт отложения нерастворимых белков).

Таким образом, в работе обнаружены два типа агрегации шаперонов, один - при росте клеток на несбраживаемых источниках углерода, и другой, имеющий место при осмотическом стрессе. Выявление белков, участвующих в образовании этих агрегатов, позволит понять биологическую роль агрегации шаперонов. Помимо этого, идентификация клеточных компонентов, участвующих в организованной агрегации неправильно свернутых белков, может быть важна для понимания молекулярных основ патогенеза так называемых «конформационных» болезней человека.

Работа выполняется при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00361).

Оптимизация условий экспрессии и тестирования биохимической активности нового фермента человека — ДНК-полимеразы и ДНК-праймазы PrimPol

Болдинова Елизавета Олеговна

Московский технологический университет, Москва

Институт Молекулярной Генетики РАН, Москва

lizaboldinova@yandex.ru

Открытый в 2013 году фермент PrimPol человека является специализированной ДНК-полимеразой, обладающей одновременно ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активностями. PrimPol играет важную роль в поддержании стабильности генома, так как может осуществлять синтез через повреждения ДНК и ре-инициировать репликацию после поврежденных участков. При исследовании PrimPol возникла существенная проблема, которая заключается в том, что рекомбинантные препараты PrimPol человека, выделенные из клеток-продуцентов *Escherichia coli*, проявляют слабую активность *in vitro*.

Целью данной работы стало определение оптимальных условий экспрессии и биохимических параметров реакции для тестирования ДНК-полимеразной активности PrimPol человека *in vitro*. Получение фермента PrimPol слитого на N-конце с GST-тагом, осуществляли путем экспрессии в клетках-продуцентах трех штаммов *E. coli* (BL21, Rosetta 2 и Arctic Express) при низкой температуре роста культуры (12-19 °С) в присутствии или в отсутствие коэкспрессированных шаперонов. Очистку фермента осуществляли с помощью аффинной хроматографии с глутатион-сефарозой, GST-таг отрезали риновирусной протеазой 3С. Для тестирования ДНК-полимеразной активности фермента изменяли такие параметры реакционной смеси и реакции, как рН буферного раствора, концентрация NaCl и время проведения реакции. Анализ результатов осуществляли с помощью ДНК-полимеразной реакции с флуоресцентно меченным олигонуклеотидным субстратом.

По результатам сравнительного тестирования было показано, что препараты фермента PrimPol, выделенные из разных штаммов *E. coli*, обладают одинаковой активностью. Обнаружено, что *in vitro* PrimPol человека обладает очень низкой стабильностью при нагревании. Активность PrimPol падает в два раза после 10 минут инкубации при 37 °С. Таким образом, рекомендованное время проведения ДНК-полимеразной реакции для PrimPol при 37 °С составляет 2,5–10 минут. Установлено, что наибольшую ДНК-полимеразную активность фермент проявляет в диапазоне рН буфера 7,0-7,4. Оптимальный для PrimPol диапазон концентраций NaCl составляет 50-100 мМ. Отсутствие NaCl в реакционной смеси и его концентрации выше 100 мМ подавляют ДНК-полимеразную активность фермента. рН буферного раствора 7,1 и концентрация 50 мМ NaCl были выбраны нами как наиболее оптимальные биохимические параметры для последующих исследований ДНК-полимеразной активности PrimPol человека.

Апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывает ингибирование теломеразы и злокачественную трансформацию CD4+ Т-клеток человека

Васина Дарья Алексеевна, Жданов Дмитрий Дмитриевич

Российский университет дружбы народов, Россия, Москва

Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Россия, Москва

darvasina@rambler.ru, zhdanovdd@mail.ru

Теломераза является белковым комплексом, который синтезирует теломерные повторы TTAGGG на 3'-концах хромосом человека. Теломераза активна в большинстве злокачественных опухолевых клеток, нормальных стволовых клетках и активированных лимфоцитах. Ранее нами было показано, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG способна вызывать альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) и ингибировать ее активность.

Целью работы явилось изучение влияния сверхэкспрессии EndoG на активность теломеразы в нормальных, не опухолевых клетках, а также на дальнейшую судьбу клеток. CD4+ Т-клетки человека трансфецировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. ОТ-ПЦР в реальном времени и метод Вестерн блоттинга применяли для изучения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Оценку активности теломеразы проводили методом TRAP (Telomeric Repeats Amplification Protocol). Методом проточной цитометрии проводили исследование иммунофенотипических характеристик клеток. Сверхэкспрессия EndoG в CD4+ клетках вызывала увеличение экспрессии сплайс-варианта hTERT и уменьшение экспрессии полноразмерного активного варианта. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT в клетках приводило к понижению активности теломеразы. Дальнейшее культивирование таких клеток приводило к их переходу в состояние репликативного старения и массивной гибели по пути апоптоза, после 24–28 удвоений популяции. Однако некоторые клетки, трансфецированные геном EndoG, оставались живыми, но не способными к делению. Исследование иммунофенотипа показало, что через 48–61 день культивирования происходила их трансформация, приводящая к развитию фенотипических характеристик Т-клеточного лимфобластного лейкоза. Трансформированные CD4+ Т-клетки обладали значительно более высокой активностью теломеразы и пролиферативной активностью, чем исходные CD4+ Т-клетки. Трансфекция CD4+ Т-клеток контрольной плазмидой pGFP не приводила к изменению экспрессии сплайс-вариантов hTERT, активности теломеразы, не вызывала гибели клеток и их злокачественной трансформации.

Таким образом, нами показано, что сверхэкспрессия EndoG способна вызывать ингибирование активности теломеразы в нормальных CD4+ Т-клетках человека и их злокачественную трансформацию в условиях *in vitro*.

Характеризация S-аденозилметионин-зависимой

метилтрансферазы MccD *E.coli*

Волович Надежда Михайловна

Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

nadezhda.volovich@skolkovotech.ru

Микроцин С – небольшая молекула-антибиотик, синтезируемая некоторыми штаммами энтеробактерий и активная против родственных им штаммов. В ходе созревания микроцин С проходит стадии рибосомального синтеза пептида-

предшественника и его посттрансляционных модификаций. Для исследования нами была выбрана редко встречающаяся в природе реакция присоединения карбоксиаминопропильной группы, акцептором которой выступает промежуточная форма микроцина С. Для ее осуществления необходимо присутствие S-аденозилметионина (SAM), выступающего в качестве донора карбоксиаминопропила, белка SAM-зависимой метилтрансферазы MccD, ответственной за перенос, а также дополнительного белкового фактора 5'-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин нуклеозидазы Mtn.

Ранее нами было показано, что в отсутствие Mtn реакция белка MccD идет в один шаг, при этом MccD образует устойчивый комплекс как с субстратами, так и с продуктами реакции. В настоящем исследовании мы продолжили изучение реакции MccD *in vitro*, основным методом стало совместное выделение компонентов реакции с очищенным рекомбинантным белком MccD на аффинной смоле в присутствии или отсутствие Mtn. Результаты выделения анализировали с помощью ВЭЖХ.

Нам удалось показать, что в отсутствие Mtn все компоненты реакции MccD, за исключением SAM, по отдельности способны прочно связываться с MccD. Помимо этого, нами были получены новые данные относительно механизма влияния белка Mtn на каталитическую активность MccD. Как известно, Mtn способен расщеплять побочный продукт реакции, MccD 5'-метилтиоаденозин (МТА), образующийся в результате отщепления с молекулы SAM карбоксиаминопропильной группы, и накопление которого токсично для клетки. Полученные данные говорят в пользу того, что Mtn взаимодействует непосредственно с комплексом MccD и его продуктов, проявляя нуклеозидазную активность по отношению к МТА, находящемуся в активном центре MccD.

SAM-зависимые метилтрансферазы, осуществляющие реакцию переноса карбоксиаминопропильной группы, являются актуальным объектом изучения с точки зрения разработки инструментов для создания антибиотических веществ. Нам удалось приблизиться к пониманию механизма одной из таких реакций, который, по-видимому, является интересным примером защиты клетки от токсичного побочного продукта.

**Свойства мутантов α В-кристаллина с заменами в С-концевом домене,
экспрессия которых коррелирует с врождёнными заболеваниями человека
Герасимович Евгения Семёновна**

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
ewgenia-gerasimowitch@yandex.ru*

α В-кристаллин (HspB5) относится к семейству малых белков теплового шока. Функции этих белков в клетке заключаются в предотвращении агрегации неправильно свёрнутых или частично денатурированных белков, регуляции процессов избирательного протеолиза, апоптоза и защиты клеток от окислительного стресса. α В-кристаллин экспрессируется практически во всех органах и тканях, его концентрация особенно велика в хрусталике глаза. Мутации α В-кристаллина коррелируют с развитием некоторых врождённых заболеваний человека. Целью данной работы было исследование физико-химических свойств мутантных форм α В-кристаллина с точечными заменами G154S, R157H и A171T, экспрессия которых коррелирует с развитием катаракты и различных форм миопатии.

Разработан метод экспрессии рекомбинантных точечных мутантов HspB5. Получены гомогенные препараты исследуемых точечных мутантов и белка дикого типа,

при этом выход рекомбинантного белка составил 40-80 мг на 1 л культуры. Методом гель-фильтрации определены кажущиеся молекулярные массы α В-кристаллина дикого типа и его мутантов, которые оказались равными 540-550 кДа для белка дикого типа и его мутантов G154S и A171T и 515 кДа – для мутанта R157H. Для исследования структуры белка использовали метод ограниченного протеолиза. При весовом соотношении кристаллин/трипсин, равном 3000/1, скорости протеолиза белка дикого типа и его G154S и A171T мутантов практически не отличались друг от друга. В этих же условиях скорость протеолиза мутанта R157H была меньше скорости протеолиза белка дикого типа, и набор образующихся пептидов отличался от пептидов, образующихся при протеолизе белка дикого типа. Метод светорассеяния был использован для изучения термостабильности полученных белков. Установлено, что полумаксимальное увеличение светорассеяния наблюдалось при температуре 73.4 °С для белка дикого типа и его мутанта R157H и при температуре 70.0 °С – для мутантов G154S и A171T. Высказано предположение о том, что изменение олигомерного состояния, устойчивости к трипсинолизу и термостабильности может быть одной из причин, влияющих на способность α В-кристаллина выполнять свои многочисленные функции.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-35-00026.

**Влияние обработки нуклеазой на свойства
ДНК-связывающей АТР-зависимой Lon-протеазы из *E. coli***

Дубовцева Е.С.¹, Куджаев А.М.²

¹*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва*

²*Институт биоорганической химии*

имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

zhenyadubovtseva@ya.ru

LonA-протеаза из *E. coli* (Ec-Lon) – мультифункциональный фермент, ключевой участник системы контроля качества клеточного протеома, функционирующей в бактериях и эукариотах. Ec-Lon деградирует дефектные и регуляторные клеточные белки по процессивному механизму (без высвобождения высокомолекулярных промежуточных продуктов) с использованием энергии АТР. Субъединица Ec-Lon состоит из центрального АТР-азного модуля (белок семейства AAA⁺), протеолитического домена (серин-лизиновая пептидгидролаза) и двухдоменной N-концевой области. Отличительной характеристикой Ec-Lon-протеазы служит ее способность к связыванию ДНК. В связи с этим, целью работы явилось выявление влияния связанной эндогенной нуклеиновой кислоты (ENA) на функционирование Ec-Lon-протеазы.

В исследовании было использовано два препарата фермента: (1) рекомбинантная Ec-Lon-протеаза, содержащая гексагистидиновый фрагмент в составе C-концевого октапептида (Lon), и (2) протеаза Lon, лишенная ENA (Lon-dNA), полученная путем обработки экстракта продуцента неспецифической нуклеазой. Проведено сравнение энзиматических свойств препаратов Lon и Lon-dNA, очищенных с помощью аффинной и анионообменной хроматографии.

Установлено, что препарат Lon содержит ENA размером в 200-400 пар оснований. Обработка нуклеазой приводит к частичному отделению нуклеиновой кислоты и к снижению эффективности функционирования АТР-азного и пептидгидролазного центров

фермента при сохранении процессивного механизма гидролиза белкового субстрата. При этом на автолитические свойства Lon наличие ENA влияния не оказывает.

Таким образом, установлено, что связанная ENA важна для регуляции активных центров фермента и не влияет на структурную стабильность Ec-Lon-протеазы.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 14_50_00131).

Антитела с ДНК-гидролизующей активностью у больных шизофренией

Ермаков Евгений Александрович

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

Научно-исследовательский институт психического здоровья, Россия, Томск

evgeny_ermakov@mail.ru

Шизофрения связана с дисрегуляцией нейротрансмиттерных процессов в центральной нервной системе и нарушениями в системе гуморального иммунитета, приводящим к образованию аутоантител (АТ) к различным антигенам нервной ткани. Среди пула аутоантител организма при заболеваниях аутоиммунной и инфекционной природы были обнаружены IgG, не только связывающие ДНК, но и гидролизующие данный субстрат.

В настоящей работе исследован титр АТ к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови и ДНК-гидролизующая активность препаратов IgG, выделенных из сыворотки крови 58 больных шизофренией и 22 здоровых доноров. Титр антител определяли с помощью ELISA. ДНКазную активность выявляли по степени гидролиза ДНК плазмиды pBluescript. Также с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии изучена структура легких и тяжелых цепей IgG больных шизофренией, системной красной волчанкой (СКВ) и здоровых доноров.

У больных шизофренией с негативной симптоматикой было обнаружено достоверное уменьшение титра АТ к однонитевой ДНК, в сравнении со здоровыми донорами, однако, в целом, уровень АТ к ДНК у больных шизофренией и здоровых доноров соответствовал референсным значениям. Впервые было показано, что IgG больных шизофренией обладают ДНК-гидролизующей активностью. С проверкой жестких критериев (электрофоретическая гомогенность антител, гель-фильтрация в условиях «рН шока») доказано, что ДНК-гидролизующая активность является собственным свойством АТ. Установлено, что относительная ДНКазная активность IgG больных шизофренией в среднем составила $55,37 \pm 32,55\%$. АТ здоровых доноров демонстрировали низкую активность ($9,12 \pm 6,5\%$). ДНКазная активность АТ у больных шизофренией с ведущей негативной симптоматикой была достоверно выше ($73,26 \pm 23,77\%$), чем у больных с ведущей позитивной симптоматикой ($43,3 \pm 33,1\%$). Легкие цепи IgG больных шизофренией и СКВ были похожими и характеризовались на масс-спектрах двумя максимумами интенсивности и дополнительным пиком в области 17,3 кДа, а легкие цепи IgG здоровых доноров имели только один максимум интенсивности.

Таким образом, впервые показано, что АТ больных шизофренией обладают ДНК-гидролизующей активностью, коррелирующей с ведущей симптоматикой заболевания, также показаны нарушения в структуре легких цепей IgG больных шизофренией,

подобные нарушения при СКВ. Полученные данные позволяют предположить, участие аутоиммунных процессов в развитии шизофрении.

Работа поддержана грантами РНФ №14-15-00480 и РФФИ №16-04-00603.

Новые белок-лигандные взаимодействия холестерина-переносящего белка StARD1 с оксистеролами и стероидными гормонами *in silico* и *in vitro*

Завадская О.А.¹, Тугаева К.В.², Фалетров Я.В.¹, Случанко Н.Н.², Шкуматов В.М.¹

¹ *НИИ Физико-химических проблем, Белорусский государственный университет, Беларусь, Минск*

² *Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Россия, Москва
biopharm@bsu.by*

Стероидогенный острый регуляторный белок (StARD1) взаимодействует с холестерином (Chol) и обеспечивает его транспорт в митохондриях, что определяет биосинтез широкого класса стероидных гормонов. Несмотря на колоссальную биологическую роль, механизм взаимодействия StARD1 с холестерином и веществами-аналогами остается исследованным не до конца. Вследствие этого, а также новых публикаций о влиянии оксистероинов и эстрогенов на функции митохондрий, мы протестировали взаимодействие StARD1 с холест-4-ен-3-оном (Chn), 7-дегидрохолестерином (7DHC), аналогом 20-гидроксихолестерина Nat 20S-yne (Nat), эстроном (E1) и прогестероном (Prog), а также флуоресцентными аналогами холестерина 3-NBD-холестаном (3NC), 22-NBD-холестерином (22NC) и его 22-нор-гомологом 20NP, *in silico* и *in vitro*. Оказалось, что положение флуоресцентной NBD-группы в области боковой цепи Chol критично для связывания со StARD1: только 22NC и 20NP давали характерный для связывания насыщающийся прирост флуоресценции. Взаимодействие нефлуоресцирующих стероидов с рекомбинантным StARD1 оценивали по их эффекту на увеличение флуоресценции 22NC при его связывании со StARD1 в молярном соотношении 1:1. Для данного препарата белка StARD1 кажущаяся K_d для 22NC составила около 20 ± 2 нМ. Chol, 7DHC, Nat, E1 и Prog уменьшали флуоресцентный ответ 22NC на связывание со StARD1 в 1,8-2,0 раза, предположительно, вследствие конкуренции за один и тот же специфичный сайт связывания. Напротив, в случае Chn флуоресцентный ответ увеличивался в 2 раза, что может указывать на несколько иной механизм его взаимодействия со StARD1. Молекулярный докинг с помощью Autodock 4.0 (pdb структура StARD1 – 3POL) показал, что: 1) Chol может специфично связываться во внутренней полости данного белка, причем остатки Arg182 и Gly180 формируют водородные связи с его 3β -ОН группой, стабилизируя комплекс; 2) остаток Glu169 может образовывать водородные связи с полярными группами боковых цепей 22NC, 20NP и Nat 20S-yne; 3) величина рассчитанной энергии связывания (ккал/моль) убывает в ряду 22NC (-12,4) < 20NP < Chn ~ Chol (-10,1) ~ 3NC < 7DHC ~ Nat < Prog < E1 (-7,9). Совместно, наши результаты подчеркивают специфику взаимодействия StARD1 с Chol и выявляют новые потенциальные лиганды этого белка, открывая новые горизонты исследований его функций.

Изменение специфичности α -подобного токсина скорпиона ВеМ9

Кульдюшев Н.А., Беркут А.А.

Московский физико-технический институт (государственный университет),
факультет биологической и медицинской физики, Москва

Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
nikita.kuldushev@phystech.edu

В рамках данной работы мы сосредоточились на изучении α -токсинов скорпионов – пептидных ингибиторов инактивации потенциал-чувствительных натриевых каналов. α -Токсины скорпионов разделяют на группы по селективности действия: млекотоксины, инсектотоксины и α -подобные токсины, действующие и на насекомых, и на млекопитающих. Они состоят из двух динамических модулей: консервативного сердцевинного модуля, который отвечает за распознавание натриевого канала и определяет эффект токсина, и варибельного модуля специфичности, топология которого, как считается, ответственна за таксономическую селективность α -токсинов скорпионов.

С помощью методов геной инженерии на основе α -подобного токсина ВеМ9 с широким профилем действия были получены его производные в бактериальной системе экспрессии. Активность производных была протестирована методом двухэлектродной фиксации потенциала с помощью ооцитов лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены потенциал-чувствительных натриевых каналов.

Для получения лигандов, избирательных к различным изоформам потенциал-чувствительных натриевых каналов, мы сконструировали несколько производных α -подобного токсина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. Для увеличения выхода производных токсина были подобраны оптимальные условия культивирования бактерий и индукции экспрессии трансгенов. Аминокислотные замены вносили таким образом, чтобы изменить гидрофобность модуля специфичности, его подвижность или топологию. Активность полученных мутантов ВеМ9 мы протестировали на трех потенциал-чувствительных натриевых каналах млекопитающих $rNa_v1.4$, $hNa_v1.5$ и $mNa_v1.6$, встречающихся в скелетных мышцах крысы, сердечной мускулатуре человека и нервной системе мыши, соответственно, и на канале таракана *Blattella germanica* $BgNa_v$.

Недавние исследования показывают, что не только рельеф варибельного модуля определяет специфичность действия α -токсинов. Модули специфичности токсинов трех разных групп отличаются также распределением гидрофобности и подвижностью. В бактериальной системе экспрессии были получены и очищены ВеМ9, а также его производные с выходом ~10 мг с 1 л культуры. Изучена активность полученных производных ВеМ9 в отношении различных изоформ каналов. Наши данные свидетельствуют о том, что каждый из рассмотренных факторов (гидрофобность модуля специфичности, его подвижность и топология) вносит важный, но не определяющий вклад в избирательность действия токсина.

Авторы выражают благодарность Стиву Пеньёру и Яну Титгату (Католический Университет г. Лёвен, Бельгия) за помощь в тестировании активности токсинов, а также Александру Василевскому (ИБХ РАН) за помощь в планировании эксперимента.

Целентеразин-зависимые копеподные люциферазы: получение и биохимические свойства

Ларионова Марина Дмитриевна^{1,2}

¹ Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, 660041, Россия, Красноярск

² Институт биофизики СО РАН, 660036, Россия, Красноярск
larionova.marina@inbox.ru

В настоящее время секретируемые копеподные люциферазы являются эффективным инструментом визуализации при проведении медико-диагностических *in vitro* и *in vivo* исследований благодаря высокой биолюминесцентной активности, а также широкому диапазону детекции. Люциферазы из морских копепод *Gaussia princeps* (GrLuc) и *Metridia longa* (MLuc) – естественно секретируемые ферменты, катализирующие реакцию окисления субстрата целентеразина с испусканием голубого света ($\lambda_{\max}=485$ нм). Данные люциферазы являются гомологичными белками небольшой молекулярной массы (16.5–23 кДа), аминокислотная структура которых представлена варибельным N-концом с сигнальным пептидом и высоко консервативным C-концом, включающим 10 цистеиновых остатков, наличие которых существенно затрудняет получение нативных люцифераз при использовании бактериальных экспрессионных систем. Предпринятые нами ранее попытки выделения исследуемых ферментов из телец включения, цитоплазмы и периплазмы *E. coli* оказались безуспешными.

В данной работе описано получение широко используемой люциферазы GrLuc и нескольких новых недавно клонированных изоформ MLuc, осуществленное с помощью бакуловирусной системы экспрессии и клеток насекомых Sf9. Нами была разработана и оптимизирована процедура очистки белков из культуральной среды, включающая дифференциальное осаждение белков сульфатом аммония, металлоаффинную и эксклюзионную хроматографические очистки. Финальная продукция гомогенных препаратов белков составила около 6 мг с 1 л культуры.

В результате исследования удалось установить биохимические свойства копеподных люцифераз как потенциальных биолюминесцентных репортеров. Нами были определены кинетические параметры, оптимальные условия работы ферментов, исследован динамический линейный диапазон детекции, наблюдаемый на протяжении 7 порядков. Было установлено, что копеподные люциферазы являются чрезвычайно термостабильными, сохраняющими до 70% активности после инкубирования в течение часа при 100°C. Несмотря на высокую аминокислотную гомологию между исследованными люциферазами, ферменты показали различия в активности, кинетике биолюминесцентных реакций, а также в температурных оптимумах (от 4 до 20°C). Установленные отличия в свойствах подтвердились и в результате исследования экспрессии копеподных люцифераз в клетках млекопитающих НЕК293.

Проведенная работа позволила охарактеризовать перспективные биолюминесцентные ферменты, обладающие уникальными свойствами, расширив арсенал существующих репортерных молекул, применимых для решения различных исследовательских задач.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант №14-14-01119).

Активность ДНК-гликозилаз NEIL1 и NEIL2 человека по отношению к субстратам, моделирующим интермедиаты транскрипции

Макашева Кристина Андреевна

*Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,
Россия, Новосибирск
kristmak6@gmail.com*

ДНК-гликозилазы человека NEIL1 и NEIL2 (эукариотические гомологи белков Frg и Nei *Escherichia coli*) проявляют повышенную активность в удалении окислительных повреждений из т.н. «глазков» — двухцепочечных участков, не стабилизированных комплементарными связями, — что может указывать на участие белков NEIL в репарации поврежденных оснований в транскрибируемых и реплицируемых последовательностях ДНК.

Олигонуклеотидные субстраты содержали поврежденное основание (8-оксогуанин или 5,6-дигидроурацил) в «глазках» разного размера (6–30 нуклеотидов) или в D-петлях, образованных с третьей цепью ДНК или РНК.

Как NEIL1, так и NEIL2 активно удаляли повреждения из одноцепочечного участка D-петли с РНК или ДНК, причем активность NEIL1 была заметно выше активности NEIL2. Наличие в D-петле дополнительного 5'-концевого одноцепочечного участка, имитирующего участок РНК, вышедший из состава транскрипционного «глазка», никак не влиял на активность ДНК-гликозилаз по отношению к субстрату. Для обоих ферментов 5,6-дигидроурацил был лучшим субстратом, чем 8-оксогуанин. Было показано также влияние размера «глазка» на активность ферментов.

Полученные результаты показывают, что белки NEIL действительно могут быть задействованы в репарации повреждений в ходе транскрипции, однако для прямого определения этого необходимо исследование активности этих ферментов на истинных интермедиатах транскрипции в комплексе с РНК-полимеразой.

Получение рекомбинантного С-концевого домена альфа-фетопротейна с добавочной аминокислотной последовательностью polyGlu21

Никольская Е.Д.², Моллаев М.Д.¹, Фаустова М.Р.¹, Яббаров Н.Г.²

¹*Московский технологический университет,*

Институт тонких химических технологий, Москва

²*Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Калужская область, Обнинск
md-mollaev@yandex.ru*

На сегодняшний день опухолевые заболевания занимают второе место по смертности в мире, уступая лишь сердечно-сосудистым. Известно, что эстроген-зависимые линии опухолевых клеток человека активно экспрессируют рецепторы альфа-фетопротейна. Использование abortивного альфа-фетопротейна человека (АФП) для направленной доставки цитотоксических лекарственных средств имеет ряд недостатков, в связи с чем появляется необходимость создания рекомбинантных аналогов.

На основе штамма *Escherichia coli* Shuffle Express и системы экспрессии T7 нами был получен рекомбинантный фрагмент альфа-фетопротейна человека с 357 по 590 аминокислоту, содержащий сайт связывания со специфическим рецептором, дополнительную вставку (polyGlu21) и his-tag на С-конце. Рекомбинантный продукт был

выделен хроматографическими методами на ионообменных и аффинных сорбентах. Специфическая активность полученного рекомбинантного белка была подтверждена методами иммуноферментного анализа с моноклональными антителами к нативному АФП, а также проточной цитофлуориметрии FITC-производного на клетках аденокарциномы яичника линии SCOV3. В ходе работы было обнаружено, что экспрессированный рекомбинантный белок локализуется как в тельцах включения, так и в цитоплазме. Показано, что культивирование и индукция экспрессии при 28°C приводит к увеличению выхода продукта, в сравнении с аналогичными действиями при оптимальных для роста температурах. Подобрана оптимальная схема рефолдинга и очистки продукта, включающая диализ из денатурирующих условий против глутатионной пары (GSH – 1 mM, GSSG - 0,5 mM), последовательную очистку на SP и Q сефарозе. Установлено, что полученный белок характеризуется высокой растворимостью и стабильностью в водном растворе (до 10 мг/мл), а также легко переносит лиофилизацию. Эксперименты *in vitro* показали, что полученный фрагмент активно подвергается эндоцитозу клетками линии SCOV3, имеющими на своей поверхности рецепторы к АФП, при 37°C и практически не проникает в клетки при 4°C. При этом независимо от температуры белок не накапливается в лимфоцитах периферической крови человека.

Полученные данные подтверждают функциональную активность белка и его механизм проникновения в опухолевые клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Физико-химические свойства и высокая специфичность полученного белка позволяют предположить, что он найдет применение в качестве векторной молекулы, способной переносить цитотоксические препараты в эстроген-зависимые опухолевые клетки с высокой селективностью.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15_15_10013).

Энантиоселективная биodeградация фенилаланина различными микроорганизмами

Рукавицына Александра Александровна, Бажутин Алексей Вячеславович

Пермский национальный политехнический исследовательский университет,

химико-технологический факультет, Россия, Пермь

otaky2011@mail.ru

Аминокислоты, являясь хиральными соединениями, могут существовать в виде двух оптических изомеров: L- и D-энантиомеров. Долгое время считалось, что все живые организмы содержат и используют в своей жизнедеятельности только L-аминокислоты, но впоследствии было показано, что D-аминокислоты входят в состав некоторых белков и метаболизируются микроорганизмами. Выяснение отличий в микробиологической трансформации оптических антиподов аминокислот представляет собой интересную задачу важную как для понимания физиологической роли D-энантиомеров, так и для создания методов биохимического синтеза D-содержащих пептидов.

В данной работе была исследована биodeградация энантиомеров фенилаланина бактериями *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas sp.* и *Bacillus subtilis*. Эксперименты проводились при температуре 29°C в среде Раймонда с pH 6.5, 6.9 и 7.5, а также в среде, содержащей глюкозу в качестве второго источника питания. Контроль концентрации субстрата осуществляли на хроматографе Shimadzu LC-20ADXR с УФ-детектором. Анализ проводили на колонке ShimPack XR-ODS II при температуре 25°C. В качестве

подвижной фазы использовали ацетатный буферный раствор (pH = 5.2), приготовленный в смешанном растворителе вода-метанол (60:40).

Установлено, что все исследованные штаммы микроорганизмов способны к утилизации обоих энантиомеров. При этом активность бактерий в деструкции D-фенилаланина значительно ниже, чем L-фенилаланина. Степень превращения D-фенилаланина может достигать почти 20%, а L-фенилаланина – 30%. В обоих случаях ряд активности микроорганизмов выглядит следующим образом: *Pseudomonas* > *R. erytropolis* > *B. subtilis*. Хроматограммы показывают, что состав продуктов деструкции для L- и D-энантиомеров различен, а большее разнообразие этих продуктов наблюдается для бактерий рода *Rhodococcus*. Добавление глюкозы в питательные среды приводит, как правило, к снижению степени превращения фенилаланина. Величина pH в исследованных пределах слабо влияет на процесс биodeградации.

Результат исследований показал возможности биохимического синтеза D-содержащих пептидов с помощью используемых микроорганизмов. Однако стоит заметить, что активность бактерий для двух хиральных молекул фенилаланина различна. Это значит, что биodeградация D-содержащих пептидов пока весьма ограничена в применении. Кроме того, на сегодняшний день, используемый метод мало изучен и требует дополнительных исследований.

Особенности функционирования протеасом при развитии воспаления у *Arenicola marina* Linnaeus, 1758 (Annelida: Polychaeta)

Становова Мария Владиславовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
mvstanovova@yandex.ru

Многощетинковые черви (аннелиды) – одна из самых значимых групп беспозвоночных в морских донных сообществах. Аннелиды обладают высокой адаптивной пластичностью и, как следствие, возможностью развития эффективной защитной системы. Ключевым компонентом защитной (иммунной) системы кольчатых червей являются целомоциты – гетерогенная популяция находящихся в целомической жидкости свободных клеток, которые обеспечивают распознавание чужеродного материала, его последующую элиминацию или изоляцию. При развитии иммунной реакции целомоциты оказываются в стрессовой ситуации, что сказывается на состоянии клеточного протеома. В регуляции гомеостаза протеома клеток у всех эукариот ведущую роль играет убиквитин-протеасомная система. Целью настоящей работы было выявление особенностей функционирования протеасом в целомоцитах *Arenicola marina* при воспалении, индуцированном введением липополисахарида.

Все эксперименты по индукции воспаления у червей *Arenicola marina* и сбор целомоцитов проводились на базе Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова. В осветлённых гомогенатах образцов определяли температурную динамику химотрипсин-подобной активности протеасом (ХПА) по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC. Нативная структура протеасомных комплексов исследовалась методом модифицированного нативного электрофореза. Содержание субъединиц и регуляторов протеасом оценивали с помощью Вестерн-блоттинга, в препаратах клеток – методом иммунофлуоресценции.

В целомоцитах *A. marina* через 1 час после индукции воспаления липополисахаридом увеличивалась ХПА протеасом, эти изменения сохранялись в течение 24 часов. Также через 1 час после индукции воспаления увеличивалось содержание α 1,2,3,5,6,7 субъединиц протеасом и протеолитической субъединицы β 5; изменялось содержание регуляторов PA700 и PA28 протеасом. Значительно возрастало содержание белков теплового шока (Hsp70). Нами впервые была исследована нативная структура протеасом целомоцитов *A. marina*. Обнаружены структурные модификации в пулах 26S- и 20S- протеасом через 1 и 6 часов после введения липополисахарида. Восстановление исходной нативной структуры протеасом наблюдалось через 24 часа после индукции воспаления.

Роль протеасом в иммунных реакциях аннелид ранее не была исследована. Полученные сведения о протеасомной системе многоклеточных организмов, находящихся на ранних этапах эволюции клеточного иммунного ответа, позволяют рассматривать изменения в нативной структуре 20S- протеасом в качестве ключевого молекулярного звена в адаптации и развитии защитных реакций у многощетинковых червей.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-00454-а.

Получение рекомбинантного гликозилированного NT-proBNP человека путем процессинга его предшественника proBNP под действием конвертазы фуринов в клетках линии Ecr1293F

Сукальская А.С., Григорьев А.П.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
anastasiyasukalskaya@gmail.com, awesomer1994@gmail.com*

Натрийуретический пептид В-типа (BNP), секретируемый клетками миокарда в ответ на повышение кровяного давления, синтезируется в виде неактивного предшественника proBNP, который в ходе процессинга подвергается гликозилированию и под действием конвертазы прогормонов фуринов расщепляется на активный BNP и неактивный гликозилированный NT-proBNP. Показано, что оба продукта процессинга proBNP являются надежными маркерами сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, сердечной недостаточности. Однако, ввиду высокой физиологической активности, BNP подвергается быстрому удалению из кровотока и последующей деградации. В связи с этим тест-система, разработанная для детекции NT-proBNP в крови на основе антител, с использованием рекомбинантного гликозилированного NT-proBNP в качестве стандартного белка, может являться эффективным инструментом для диагностики сердечной недостаточности. Поэтому целью работы являлось получение рекомбинантного гликозилированного NT-proBNP человека путем процессинга его предшественника, proBNP, в клетках линии Ecr1293F и изучение его иммунохимических свойств.

Для экспрессии в эукариотических системах была получена молекулярно-генетическая конструкция, содержащая кДНК человеческого proBNP с сигнальной последовательностью Gluc (*Gaussia luciferase*), отвечающей за секрецию белка из клетки. Полученную плазмиду котрансфецировали с плазмидой, содержащей кДНК конвертазы прогормонов фуринов, методом липофекции в клетки линии Ecr1293F в соотношениях 1:1, 1:5 и 5:1. Количественную оценку динамики экспрессии proBNP и его процессированных форм проводили методом ФИА “сэндвич”-типа в трех комбинациях антител. Выделение и

очистку NT-proBNP проводили методом иммунопреципитации. Чистоту полученного препарата оценивали методами вестерн-блоттинга и ПААГ электрофореза в присутствии ДСН. Наличие гликозилирования детектировали методом вестерн-блоттинга.

В результате был разработан метод получения гликозилированного иммунохимически активного NT-proBNP при коэкспрессии proBNP с фурином в клетках млекопитающих. Степень процессинга proBNP в клетках Epxi293F составила 28,8% в случае соотношения proBNP:фурин как 5:1, 13,5% – в случае соотношения proBNP:фурин как 1:1 и 3,5% – в случае соотношения proBNP:фурин равного 1:5.

Отсутствие цитотоксического действия кардиотонических стероидов в клетках грызунов: роль $\alpha 1$ субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы

Тверской А.М.¹, Акимова О.А.¹, Смольянинова Л.В.¹, Монгин А.А.², Лопина О.Д.¹, Ла Дж.³, Дулин Н.О.³

¹ *Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

² *Медицинский Колледж США, Олбани*

³ *Университет США, Чикаго*

Tverskoiam@gmail.com

В клетках крыс и мышей широко распространенная $\alpha 1$ -изоформа Na^+, K^+ -АТФазы ингибируется убаином и другими кардиотоническими стероидами (КТС) при концентрациях в 1000 раз превышающих необходимые для эффективного ингибирования клеток других млекопитающих. Для дальнейшего изучения роли КТС-резистентной $\alpha 1\text{R}$ - и КТС-чувствительной $\alpha 1\text{S}$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы мы сравнили действие убаина на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ и жизнеспособность астроцитов человека и крысы, гладкомышечных клеток сосудов человека и крысы (HASMC и RASMC), клеток эндотелия человека и крысы (HUVES и RAEC). Кроме того, мы провели такие же эксперименты для гладкомышечных клеток сосудов мыши (MASMC), выделенных из мышей дикого типа $\alpha 1^{\text{R/R}}$ и мышей $\alpha 1^{\text{S/S}}$, экспрессирующих человеческую $\alpha 1$ -субъединицу Na^+, K^+ -АТФазы. 6 ч инкубации HASMC и HUVES с 3 мкМ убаина значительно увеличивают соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, тогда как такое же изменение этих параметров происходит в RASMC и RAEC при действии 3000 мкМ убаина. В HUVES убаин запускает фосфорилирование p38, в то время как в RAEC фосфорилирование ERK1/2 MAPK. 24 ч инкубации с 3 мкМ убаина приводит к гибели всех типов клеток человека. Смерть клеток мы установили с помощью фазово-контрастной микроскопии, по активности каспазы-3 и распаду хроматина. В отличие от клеток человека, нам не удалось обнаружить какой-либо эффект действия 3000 мкМ убаина на жизнеспособность клеток крысы. Так же как и в клетках крысы, 3000 мкМ убаина не влияют на жизнеспособность MASMC, выделенные из мышей дикого типа, но запускает клеточную смерть MASMC из мышей $\alpha 1^{\text{S/S}}$. Жизнеспособность клеток измеряли по высвобождению ЛДГ. Кроме того, трансфекция $\alpha 1\text{R}$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы крысы защищает HUVES от смерти при 24 ч инкубации с высокими дозами убаина. Таким образом, мы впервые показали, что кардинальные различия в цитотоксическом действии убаина на клетки крысы и мыши вызваны особенностями $\alpha 1\text{R}$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы, а не какими-либо другими КТС-зависимыми/чувствительными интермедиатами, вызывающими смерть клеток.

Эта работа осуществлялась при поддержке РФФИ (14-04-31705, 15-04-00101) и РНФ (14-15-00006).

**Сравнительный протеомный анализ активных и покоящихся
клеток *Mycobacterium smegmatis*
Трутнева К.А., Шлеева М.О., Демина Г.Р., Капрельянец А.С.
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва
trutneva-k@mail.ru**

Известно, что возбудитель туберкулеза - *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) может образовывать покоящиеся формы вследствие адаптации к неблагоприятным условиям. Эта способность приводит к развитию латентного туберкулеза у одной трети мирового населения. Выявление биохимических особенностей покоящихся микобактерий необходимо для понимания этого процесса. Объектом исследования являлся быстрорастущий непатогенный родственник МТБ - *Mycobacterium smegmatis*, образующий покоящееся состояние, характеризующееся измененной морфологией бактерий, пониженной метаболической активностью и устойчивостью к антибиотикам. Методом двумерного электрофореза и MALDI-TOF анализа с последующей денситометрией пятен были выявлены особенности белкового состава покоящихся форм (ПФ).

Обнаружено, что в протеоме ПФ хорошо представлены ферменты, участвующие в процессах деградации жиров, белков и пептидов, что, возможно, позволяет поддерживать основной метаболизм довольно длительное время. Обнаружено значительное количество ферментов, участвующих в защите от окислительного стресса. Выявлены белки, участвующие в синтезе порфирина и трегалозы, что совпадает с полученными данными по накоплению этих веществ в покоящихся микобактериях. Также обнаружено большое количество трансфераз, алкогольдегидрогеназ, ферментов биосинтеза ГМФ. Кроме этого, выявлены ферменты основных энергетических путей: гликолиза, цикла Кребса, глиоксилатного пути, биосинтеза аминокислот. Однако, поскольку в ПФ отсутствуют выраженные синтезы АТФ, то можно заключить, что эти ферменты являются запасенными и необходимы для быстрого запуска процесса реактивации при наступлении благоприятных условий.

В ПФ обнаружено большое количество белков с неизвестной функцией, отсутствующих у активных бактерий. Среди них RadR-подобный белок MSMEG_6227, который образует комплексы с различной молекулярной массой. В отличие от активных клеток в ПФ практически не выявлены белки, участвующие в метаболизме ДНК, синтезе S-аденозилметионина, миколовых кислот, пиридоксина, жирных кислот, фосфатидилинозитола.

Эти данные свидетельствуют о том, что в покоящемся состоянии у бактерий наблюдаются изменения в белковом составе цитозоля и мембран, что обеспечивает адаптацию бактерий в переходе от активного в покоящееся состояние.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-15-00245.

Новая фосфонатаза у штамма-деструктора глифосата *Achromobacter* sp. Kg 16

Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Леонтьевский А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН,

Россия, Пуцино

hunter_dimok@mail.ru

Одной из актуальных проблем современной экологии среды является бесконтрольное поступление в окружающую среду больших объемов устойчивых фосфорорганических ксенобиотиков – органофосфонатов, среди которых наиболее распространен неселективный гербицид глифосат (ГФ), обладающий трудногидролизуемой связью углерод-фосфор (С-Р связь). ГФ токсичен для позвоночных и беспозвоночных, способен накапливаться в почвах и водоемах. Деградация ГФ в природных средах обеспечивается действием ферментных систем ряда микроорганизмов-деструкторов, в частности фермента фосфонатазы. В настоящей работе рассматривается новая фосфонатаза, обнаруженная у деструктора ГФ *Achromobacter* sp. Kg 16, отличавшегося высокой эффективностью деструкции ГФ в условиях почв.

При осуществлении данной работы использовались классические и современные методы микробиологии и биохимии: периодическое культивирование, разрушение биомассы с помощью ультразвука и френч-пресса, осаждение белков сульфатом аммония, хроматография при высоком и среднем давлении, SDS-PAGE, спектрофотометрические измерения.

В литературе описана фосфонатаза *Bacillus cereus*, не способная участвовать в метаболизме ГФ и представляющая собой гомодимер массой 60 кДа, однако такой фермент у *Achromobacter* sp. Kg 16 обнаружен не был. С помощью разработанной нами схемы очистки был получен электрофоретически гомогенный препарат фермента, гидролизующего фосфоацетальдегид с образованием ацетальдегида и ортофосфата и индуцирующегося при росте *Achromobacter* sp. Kg 16 на средах с ГФ. Фермент представлял собой мономер с молекулярной массой около 20 кДа, оптимальным диапазоном значений pH 7,2–7,6, $K_m=0,889$ мМ, $V_{max}=1,2$ ФЕ/мг белка, $k_{cat}=0,4$ с⁻¹, и каталитической эффективности $k_{cat}/K_m=4,5 \times 10^2$ л моль⁻¹ с⁻¹. Фермент сохранял свыше 80% своей активности в диапазоне температур 45–50 °С, но быстро инактивировался при 60 °С.

Перечисленные параметры резко отличались от таковых у фосфонатазы *B. cereus*, что позволило говорить о выделении нового фермента и ставить задачи дальнейших его исследований, таких как изучение происхождения новой фосфонатазы, её роли в метаболизме как глифосата, так и природных фосфонатов. Помимо научной новизны, более глубокое изучение нового фермента также актуально с практической точки зрения, так как очевидна зависимость эффективности деструкции ГФ штаммом *Achromobacter* sp. Kg 16 от характеристик участвующих в данном процессе ферментов.

Анатомические особенности стебля Качима метельчатого *Gypsophila paniculata* L. в связи с формированием жизненной формы перекасти-поле

Брикнер Мария Юрьевна

Волгоградский Государственный университет, Россия, Волгоград

masha_brikner94@mail.ru

Растения из группы перекасти-поле широко распространены в степных сообществах, некоторые из них – трудно искоренимые сорняки. Существует дефицит сведений об анатомическом строении зоны отделения у представителей этой жизненной формы.

Настоящая работа посвящена изучению анатомических особенностей стебля качима метельчатого *Gypsophila paniculata* L., представителя семейства *Caryophyllaceae* Juss., в связи с формированием жизненной формы перекасти-поле. Для изучения структуры узлов, по которым происходит отделение, использовали 12 однолетних побегов, собранных в Урюпинском районе Волгоградской области в июне 2014-2015 г. У каждого побега выполняли радиальные срезы на уровне узла по всей длине вегетативной части оси 1 порядка. В каждом узле проводили измерения толщины ксилемы, толщины клеточных стенок одревесневших паренхимных клеток, заполняющих прорыв перицикла на уровне узла, отмечали наличие межклетников. Статистическую обработку проводили с помощью программы STATISTICA 10.

На участке стебля от уровня почвы до соцветия происходит постепенное механическое ослабление узлов за счёт уменьшения толщины кольца ксилемы и толщины клеточных стенок одревесневших паренхимных клеток, заполняющих прорыв перицикла. Во 2 - 5-м узлах от уровня почвы между одревесневшими элементами формируются межклетники. Специальный отделительный слой не образуется.

Уменьшение объема ксилемы и толщины одревесневших паренхимных клеток снизу-вверх согласуется с архитектурными принципами строения надземных осей растений, согласно которым их следует считать балками равного сопротивления. Эти сужающиеся упругие конструкции пружинят при изгибе, равномерно распределяя напряжение по всей длине. Так ведёт себя стебель качима до созревания семян. После созревания ткани побега подсыхают, становятся жесткими и хрупкими. К этому времени в узлах формируются многочисленные межклетники, которые приводят к локальному ослаблению прочности. В результате при порывах ветра напряжение не будет равномерно распределяться по оси, что приводит к разрыву в опасных сечениях.

Основной причиной отделения перекастывающейся части побега у *G. paniculata* следует считать формирование межклетников в узлах.

Влияние ингибитора полярного транспорта ауксина на морфогенез листа и генеративных структур при фасциации у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Быкова Екатерина Алексеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

katebykova.90@mail.ru

Фасциация – это явление, при котором меристема изменяется в объеме, за счёт увеличения роста пула клеток в центральной зоне меристемы (в некоторых случаях - в 1000 и более раз). Это может приводить к разделению меристемы на несколько (чаще на два) очагов, которые в дальнейшем функционируют как абсолютно самостоятельные точки роста. Так же могут происходить изменения в филлотаксисе, так как при увеличении объёма меристемы увеличивается и площадь поверхности периферической зоны, в результате чего может увеличиваться число одновременно закладывающихся примордиев листьев, что и приводит к изменению листорасположения.

У *Arabidopsis thaliana* типичное спиральное листорасположение заменяется на супротивное или мутовчатое (в зависимости от степени проявления фасциации). Развитие пестика у фасциированных мутантов сопровождается появлением крупной терминальной структуры, центральную часть которой, занимает группа недифференцированных, меристематических клеток, окаймленная рыльцевой тканью.

При добавлении ингибитора полярного транспорта ауксина N-1-нафтилфталамовой кислоты (НФК) объем меристемы увеличивается как у мутантных растений, так и у контрольных. Так у контрольных линий проявляются те же признаки, что и у фасциированных мутантов (изменение филлотаксиса и нарушение флорального морфогенеза). Так же происходит увеличение числа прилистников у всех исследуемых растений (до 10 прилистников у мутантных линий). При флоральном морфогенезе под воздействием НФК происходит еще большее разрастание пула меристематических клеток.

Молекулярная филогения и карпология рода *Scorzonera sensu lato*

Заика Максим Александрович

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

delphinium-consolida@yandex.ru

Род *Scorzonera* L. насчитывает не менее 180 видов и относится к подтрибе *Scorzonerinae* (*Cichorieae*–*Asteraceae*). Его объем неоднократно пересматривался на основании морфологических и палинологических признаков. Результаты молекулярной филогении свидетельствуют о полифилии *Scorzonera*, который распадается на ряд родов разного систематического положения внутри *Scorzonerinae* (*Scorzonera* s.str., *Podospermum*, *Lasiospora*, *Takhtajianantha* и др.). Однако такому важному в систематическом отношении признаку, как анатомии семян было уделено недостаточно внимания.

Материал для исследований (120 видов рода *Scorzonera* s.l) был собран в различных областях Евразии или взят из гербарных фондов В, BR, Е, FRU, МНА, MW, LE. Мы изучили анатомическое строение краевых семян на поперечных срезах в трёх зонах: в основании, в середине и на верхушке. Филогенетические отношения этих же представителей рода были проанализированы на основании молекулярно-филогенетического анализа участка ITS ядерной ДНК. Для 60 видов последовательности нами были получены впервые.

Полученные нами молекулярно-филогенетические результаты свидетельствуют о разделении рода *Scorzonera* s.l. на следующие группы разного систематического положения внутри *Scorzonerinae*: клады *Scorzonera* s.str. (тип – *S. humilis*), *Achyroseris*, *Podospermum*, *Lasiospora*, *Pseudopodospermum*, *Takhtajaninatha* и ряд других, более мелких групп. Крупные группы *Scorzonera* s.l. карпологически хорошо очерчены и отличаются друг от друга по строению перикарпия (его толщиной, общей топографией анатомических зон, мощностью, очертаниями склеренхимы и направленностью ее волокон, разной выраженностью воздухоносных полостей). Для группы *Podospermum*, как одному из наиболее критических таксонов *Scorzonerinae*, среди всех признаков, известных ранее, мы выделили три уникальных: рожковидные придатки на внешних листочках обёртки, разнонаправленные волокна в склеренхиме перикарпия и наличие полой тубулярной части («ножки») в основании семянки, которая отличается по анатомическому строению от схожих образований в *Scorzonera* s.l. Кроме того, результаты молекулярно-филогенетического анализа и данные о строении семян однозначно свидетельствуют о невозможности сохранения секций *Incisa* и *Purpurea* в пределах рода *Podospermum*.

Таким образом, в составе трибы наряду с такими филогенетически хорошо очерченными родами, как *Tragopogon*, *Geropogon*, *Pterachaenia*, *Tourneuxia*, *Koelpinia*, *Epilasia* и *Scorzonera*, следует признать, как минимум, *Podospermum*, *Pseudopodospermum*, *Lasiospora*, *Achyroseris* и *Takhtajaninatha*.

Работа финансирована по госконтракту МГУ часть 2.

Анатомические особенности строения побегов инвазионных видов рода

***Solidago* L. s.l. (Compositae)**

Зайченко София Германовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

zaychenko_so@mail.ru

Род *Solidago* L. включает 100–120 видов с наибольшим разнообразием в Северной Америке. 3 вида стали в Европе инвазионными: *S. canadensis* L., *S. gigantea* Aiton и *S. graminifolia* (L.) Salisb. (*Euthamia graminifolia* (L.) Nutt.). Эти виды различаются по характеру роста: *S. canadensis* является короткокорневищным растением с обильным ветвлением корневища, *S. gigantea* обладает удлиненным и малоразветвленным корневищем, у *S. graminifolia* длина корневищ наибольшая.

В этой работе были рассмотрены основные анатомические особенности строения побегов перечисленных видов. Особое внимание уделялось наличию и количеству эфирномасличных вместилищ в корневищах и стеблях, т.к., вероятно, от этой анатомической особенности зависит устойчивость видов рода *Solidago* к галлице *Eurosta solidaginis* (Fitch, 1855), вызывающих галловые разрастания на надземных частях побегов.

Материал для исследования собран в окрестностях г. Звенигород Московской области в 2012 году. Особенности ветвления изучены на выкопанных и отмытых от грунта растениях. Анатомическое исследование побегов проведено на поперечных срезах с применением реакции на одревеснение по стандартной методике.

Анализ строения ортотропных однолетних надземных побегов показал, что для всех видов характерно сильное одревеснение ксилемы, большое количество паренхимы в сердцевине, а также отсутствие эфирномасличных вместилищ. В строении подземных плагиотропных корневищ между видами наблюдались существенные различия. *S.*

canadensis обладает наибольшей степенью одревеснения сердцевины, некрупными одиночными эфирномасличными вместилищами, которые располагаются исключительно в кортексе. В корневище *S. gigantea* крупные эфирномасличные вместилища находятся не только в первичной коре, но и в сердцевине, часто отмечается их парное расположение, число эфирномасличных вместилищ значительно превышает таковое у *S. canadensis*. В стеблях *S. graminifolia* наблюдается мощная сильно одревесневшая ксилема и почти полая паренхиматозная сердцевина. Корневище обладает хорошо развитым кортексом и малой степенью лигнификации, однако, эфирномасличные вместилища отсутствуют.

Таким образом, выявлены видоспецифические особенности анатомического строения побегов изученных видов. Степень одревеснения и развития ксилемы, длительность функционирования корневищ коррелирует с их длиной: короткокорневищный *S. canadensis* обладает длительно живущими подземными побегами с мощной ксилемой, *S. graminifolia* имеет недолговечные побеги с меньшим одревеснением, для *S. gigantea* характерно промежуточное значение. Система эфирномасличных вместилищ требует дальнейшего изучения.

Морфологические особенности кавказских видов рода *Euphrasia* L.

Ипатова Дарья Андреевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

4vkontakte95@mail.ru

Род *Euphrasia* L., относящийся к трибе Rhinanthae семейства Scrophulariaceae (согласно системе классификации APG III 2009 г., относящийся к семейству Orobanchaceae), на территории России представлен травянистыми однолетними растениями. Систематика данного рода осложнена интенсивностью видообразования и наличием значительного морфологического сходства некоторых видов. В более глубоком изучении нуждаются виды, произрастающие на Кавказе.

В работе рассмотрены морфологические особенности некоторых кавказских видов рода *Euphrasia*, такие как *E. caucasica* Juz., *E. hirtella* Jord. ex Reut., *E. ossica* Juz., *E. pectinata* Ten. и другие. Особое внимание уделено характеру и интенсивности опушения листьев, традиционному признаку, принимаемому для таксономического разграничения видов.

Полевой материал был собран на территории Тебердинского государственного природного биосферного заповедника в 2015 г., также использованы фонды Гербария Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова и Гербария Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН.

Опушение изучалось при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM.

Анализ данных показал, что опушение у исследуемых видов различается достаточно хорошо. Выявлено несколько его типов: простое, коротко железистое и длинно железистое. Помимо типа опушения различается также и расположение трихом на поверхностях листьев. У большинства видов на нижней стороне листа по краю располагаются короткие железистые трихомы, а в середине и по жилкам листа можно увидеть различные сочетания типов опушения, либо его полное отсутствие. На верхней стороне листа у большинства видов выявлено простое опушение, иногда к нему могут добавляться и железистые трихомы. Различий опушения листьев разной формации у

одного растения выявлено не было. У низовых, срединных и верховых листьев тип и расположение трихом одинаковы.

Таким образом, выявлены видоспецифические морфологические особенности опушения листьев у исследуемых видов, которые не были описаны ранее. По полученным данным можно сказать, что в дальнейшем этот признак можно использовать в систематике кавказских видов рода *Euphrasia* и при сопоставлении их с другими видами данного рода, произрастающими на территории России и Европы.

Морфология и развитие гинецеев с одногнездной завязью в семействе Araliaceae (Ariales) на примере некоторых видов из рода *Polyscias*

Карпунина Полина Владимировна, Нуралиев Максим Сергеевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

p.karpunina@yandex.ru

В эволюции некоторых групп покрытосеменных произошел переход от синкарпного гинецея с несколькими плодолистиками к гинецею с единственным плодолистиком. Подобная редукция могла проходить через промежуточные стадии с одним фертильным и одним или несколькими стерильными плодолистиками (псевдомономерия) или путем резкого изменения мерности гинецея (мономерия). Вопрос перехода к гинецею с одним плодолистиком исследуется нами на примере представителей рода *Polyscias* (Araliaceae), в котором имели место полимеризация и олигомеризация гинецея. Независимые переходы к одногнездной завязи с одной фертильной семязпочкой произошли в четырех группах *Polyscias* s.l.. Нами подробно изучена морфология и развитие гинецея *P. diversifolia* и *P. aff. schultzei*, представляющих две разные группы.

Гинецей *P. diversifolia* закладывается в виде кольцевого примордия без следов дополнительных плодолистиков. В ходе дальнейшего развития края примордия постгенитально смыкаются в виде шва, окруженного короткими лопастями, которые нельзя считать следами редуцированных плодолистиков из-за непостоянства их формы, числа, а также из-за позднего появления в ходе морфогенеза. Гинецей *P. aff. schultzei* закладывается в виде подковообразного примордия. Его края затем постгенитально срастаются с образованием шва, который проходит от основания до верхушки гинецея и немного заходит на его противоположную сторону, разделяя верхушку гинецея на две части, которые, однако, явно не могут трактоваться как следы двух плодолистиков. У изученных видов ориентация шва может варьировать относительно органов цветка и кроющего листа. При изучении анатомического строения гинецеев *P. diversifolia* и *P. aff. schultzei* следы редуцированных плодолистиков также выявлены не были.

Таким образом, мы не обнаружили следов стерильных плодолистиков в гинецее изученных видов. По-видимому, утрата плодолистиков в эволюции групп, представленных ими, осуществлялась без промежуточных стадий. В этом случае гинецей *P. diversifolia* и *P. aff. schultzei* можно трактовать как мономерный, а не псевдомономерный. Для проверки гипотез о мономерии/псевдомомерии одногнездных завязей в различных группах *Polyscias* необходимы дальнейшие исследования с привлечением более обширного сравнительного материала в контексте данных по филогении группы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 15-04-05836).

Особенности онтогенетического развития гаметофита *Botrychium multifidum* (S.G. Gmel.) Rupr. при культивировании в условиях in vitro

Малахова Ксения Вячеславовна, Зонтиков Дмитрий Николаевич,

Марамохин Эдуард Владимирович

ФГБУ ВПО Костромской государственной университет имени Н.А. Некрасова,
Россия, Кострома

malakhova.kv1@gmail.com

Исследованию развития гаметофита папоротников посвящен ряд работ, однако для решения спорных вопросов систематики и филогении необходимо сопоставление генеративной фазы развития различных видов. Наибольший интерес представляет семейство *Ophioglossaceae*, представители которого отличаются по морфологии от других существующих папоротников, в частности, *B. multifidum*, включенный во многие региональные Красные книги. Целью нашего исследования является изучение особенности онтогенетического развития гаметофита *B. multifidum* методом проращивания спор в культуре in vitro.

В качестве донорных эксплантов использовали сорусы, из которых впоследствии выделяли споры; стерилизация была проведена с использованием кратковременного обжига. Для культивирования использовали питательную среду MS с добавлением мезоинозита в концентрации 100 мг/л, глицина – 2 мг/л; тиамин – 0,5 мг/л; пиридоксина – 0,5 мг/л; и питательную среду Knudson с добавлением мезоинозита в концентрации 100 мг/л, тиамин – 0,4 мг/л; в качестве регуляторов роста использовали кинетин в концентрации 1,0 мг/л; сахарозы – от 2 до 20 мг/л; агара – 5,0 мг/л; уровень pH 4,0-6,0. Культивирование спор проводили в темноте.

На проксимальной части споры хорошо заметен трехлучевой тетраидный рубец. Через четверо суток в споре начинается митоз. На 7-8 сутки оболочка споры разрывается по рубцу, из споры появляется первичный ризоид, внутри споры начинается формирование протонемы, продолжающееся около 25 суток. Протонема представляет собой 8-12 клеточную структуру. Формирования проталлия продолжалась 50-70 суток. Зрелый гаметофит *B. multifidum* имеет дисковидную форму и образован паренхиматозной тканью. Стадия его формирования занимает 20-40 суток.

B. multifidum имеет период развития гаметофита в культуре in vitro 4-5 месяцев. В природе основная масса спор прорастает на следующий год. Преимущества метода - в значительном упрощении наблюдения за развитием гаметофита, исключении ошибок при идентификации. Это позволяет рекомендовать использование данного метода для изучения развития гаметофитов.

Структурное разнообразие эпидермы листьев представителей

рода *Gnetum* L. (Gnetaceae)

Пагода Янина Олеговна

Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург
Ботанический институт имени Л.В. Комарова, Россия, Санкт-Петербург

ianinapagoda@gmail.com

Изучению различных аспектов строения и развития листа гнетовых, в частности представителей рода *Gnetum* L., посвящено довольно много публикаций. Однако относительно небольшое число изученных к настоящему времени видов не позволяет в

полной мере оценить степень разнообразия листьев в пределах рода. Данная работа нацелена на выяснение того, насколько однотипными с цветковыми растениями были эволюционные преобразования покровной ткани в ходе становления рода *Gnetum*.

Исследована эпидерма листьев у 15 видов гнетумов. Работа выполнена с использованием традиционных методов световой и сканирующей электронной микроскопии, эпидермального анализа и математической обработки данных.

Рассмотренные листья, по классификации Раункиера (1934), мелкие 9,8-20 см² и средних размеров 21-60 см², гипостоматные. Единичные устьица отмечены у части видов над крупными жилками в верхней эпидерме. Доминирует парацитный тип устьиц. Устьичный индекс у большинства видов малый (6,8-10,8%). Форма клеток непостоянна внутри рода. Верхняя эпидерма сложена, как правило, клетками средних размеров, нижняя – крупноклеточная. Коэффициент извилистости их антиклинальных стенок колеблется от 1,01 до 1,56 в верхней эпидерме и от 1,04 до 1,46 в нижней. В покровной ткани 13 видов обнаружены абортированные устьица. На поверхности эпидермы 10 видов выявлены коровые бородавки.

Всего использовано 16 признаков, описывающих строение покровной ткани. Их коэффициент вариации колеблется от 4,7 до 63,5%. Полученные значения последнего сравнимы со значениями коэффициентов аналогичных признаков у цветковых растений.

Эпидерма листьев рода *Gnetum* характеризуется значительным структурным разнообразием. Оно основывается на тех же комплексах признаков, что и у цветковых растений и связано с изменением в ходе эволюции рода *Gnetum* числа и величины клеток, слагающих эпидерму пластинки, степени развития в ней устьиц (устьичного индекса, плотности размещения устьиц и их величины), а также формы основных клеток.

Специфичным для гнетумов является присутствие в эпидерме части видов абортированных устьиц и их варьирующее соотношение с числом дифференцированных устьиц.

Загадочные образования на поверхности мегаспор плауновидных растений из юрских отложений Русской платформы

Платонова Анна Глебовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

platon-anna@yandex.ru

При анализе растительных остатков, полученных в результате промывки среднеюрских пород из Московской (с. Верхнее Мячково) и Архангельской областей (р. Яренга), я обнаружила несколько дисперсных мегаспор диаметром около 1 мм. Три мегаспоры, отнесенные к широко известным мезозойским формальным видам, по ультраструктуре спородермы сближаемым с современными селягинеллами – *Triletes murrayi* (Harris) Marcinkiewicz и *T. sp. aff. T. spurius* (Dijkstra) Potonié из с. Мячково и *T. candoris* Marcinkiewicz с р. Яренга – представляют наибольший интерес. На их гладкой поверхности без особого порядка и в разном числе располагаются выпуклые округло-треугольные в плане, с каймой в основании образования около 60 мкм в диаметре и 20 мкм в высоту.

На первый взгляд ботаника, эти загадочные образования напоминают каких-то беспозвоночных животных, например, раковинных амеб типа *Arcella*, однако более детальное изучение выявляет их растительную природу. Эти образования плотно

прилегают к поверхности мегаспоры, но их легко можно отделить с помощью препаровальной иглы. При этом обнажается неповрежденная поверхность мегаспоры, что не позволяет считать эти образования спорами грибов, которые иногда находят на поверхности ископаемых мегаспор. По ультратонкому строению они значительно отличаются от разноразмерных округлых бородавок, встречающихся на мегаспорах с подобной морфологией. Изучив отделенные от мегаспоры образования с помощью светового микроскопа и СЭМ, а также на ультратонких срезах с помощью ТЭМ, мы пришли к выводу, что среди современных растений они наиболее схожи с микроспорами *Selaginella*.

Несмотря на то, что и мегаспоры, и прикрепленные к их поверхности микроспоры близки к современным селягинелам, их принадлежность к одному растению невозможно установить без находок обоеполых стробилов, содержащих такие микроспоры и мегаспоры одного из трех указанных видов. Кроме того, можно только гадать, как происходила адгезия микроспор на поверхности мегаспор, тем более что в современной флоре неизвестны случаи подобного прикрепления микроспор к гладкой поверхности мегаспор. Таким образом, необычная находка до сих пор еще таит в себе много загадок, поиски ответов на которые помогут прояснить особенности жизни и размножения ископаемых растений, обладавших этими спорами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01412а.

К вопросу изучения новой разновидности *Artemisia sieversiana* Willd. в условиях Западного Забайкалья

Сахьяева Аюна Булатовна

*ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет», Россия, Улан-Удэ
ayuna.sahyaeva@mail.ru*

По данным многих исследователей отмечено, что для полыни Сиверса характерны промежуточные формы, что свидетельствует о ее полиморфизме и нахождении достаточно четких морфологических различий между разновидностями *Artemisia sieversiana* Willd. Это может рассматриваться, как результат специализации их к различным условиям в современной экологической обстановке.

Материал был собран в период летнего полевого сезона 2015 года на территории Селенгинского среднегорья в предгорьях хр. Малый Хамар-Дабан (Западное Забайкалье). Эколого-популяционные и флористико-геоботанические исследования проводились маршрутным и полустационарными методами. Растения определяли по «Флоре Сибири» и «Определителю растений Бурятии». Образцы семян собраны из исследованных популяций природной флоры. При изучении семян, было рассмотрено около 70 экземпляров под микроскопом МБИ-1 при увеличении 3,5x10.

В ходе исследований была выявлена оригинальная популяция *Artemisia sieversiana*, особи которой имеют значительные морфологические отличия. Полынь доминировала в злаково-осочково-полынной группировке, сформированной на опушке постпирогенного остепненного листовничника. Основное отличие особей данной разновидности состоит в иных пропорциях листовых сегментов и сегментиков, в узком соцветии, в сжатой метелке с крупными бокаловидными корзинками. В морфологии семян выявлены существенные отличия – глянцево-кожистая поверхность семенной кожуры, удлинено-вытянутой и

слегка изогнутый апикальный полюс семян. Также для нее свойственна изящная жизненная форма растения в целом и мелкие размеры листьев.

Отмеченная разновидность, судя по литературным источникам, близка к *Artemisia sieversiana*: var. *gracilis*, которая была описана Н. С. Филатовой на территории Казахстана.

Во флоре Бурятии данная разновидность ранее не приводилась, что дает возможность для ее дальнейшего изучения и вероятно, выделения ее в особый статус подвида *Artemisia sieversiana*: subspecies *gracilis* – *buryatica*. Однако это требует серьезного таксономического обоснования систематических признаков с привлечением морфокарпологического, фитохимического, молекулярно-генетического и других методов анализа.

Строение и развитие листоподобных выростов на листовой пластинке мутантов *Arabidopsis thaliana tae 4β* и *tae sa*

Федотов Алексей Павлович, Силина Виктория Валерьевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

alex-f96@yandex.ru, silina.viktoriya@inbox.ru

Для геммаксиллярных растений расположение органов четко детерминировано, в частности для листьев характерна локализация на узлах побега. Однако существуют редкие исключения. Например, на листьях *Begonia hispida* var. *cucullifera* были обнаружены листоподобные выросты. Похожие структуры известны для мутантов *Arabidopsis thaliana tae 4β* и *tae sa*, однако ранее описывали только их внешнее строение при помощи методов электронной микроскопии.

Для исследования гистогенеза мы провели анатомо-гистологическое исследование зафиксированного в 70% этаноле материала из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ. При получении постоянных препаратов мы использовали стандартные методики обезвоживания материала, заключения в парафин с последующим получением анатомических срезов. Окрашивание проводилось карболовым фуксином и гематоксилином Делафильда, образцы заключались в канадский бальзам. Для оценки экспрессии генов применялся метод тестирования активности репортерного гена *GUS*.

В центральной части листовых пластинок выявлена эктопическая экспрессия трансгена *KNAT1::GUS*. Край многих листовых пластинок мутантов утолщен и завернут. Для этой области в ходе анализа экспрессии генной конструкции *DR5::GUS* показано накопление активного ауксина. На абаксиальной и адаксиальной сторонах у края пластинки могут формироваться листоподобные выросты. На ранних стадиях развития они анатомически сходны с формирующей их тканью, и не проявляют признаков бифациального строения. На более поздних стадиях развития они приобретают черты дорзовентрального строения, напоминающего структуру нормальной листовой пластинки: в наиболее крупных выростах обнаружена дифференциация на столбчатую и губчатую хлоренхиму.

Таким образом, для листоподобных выростов характерна тенденция к восстановлению дорзовентральной полярности. На ранних стадиях развития формирующиеся выросты похожи на развивающиеся пьедесталы трихом. Возможно,

данные мутации ведут к нарушению генетических механизмов формирования трихом, что приводит к разрастанию последних в листоподобные выросты.

Исследование поддерживается грантом РФФИ №16-04-00437.

Морфология женского цветка *Hopkinsia anoectocolea* (Anarthriaceae) в связи с вопросом о путях возникновения односемянных плодов в порядке Poales

Фомичёв Константин Игоревич

МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва

constantin.fomichev@gmail.com

Большинство видов ветроопыляемых цветковых растений имеет односемянные плоды, а нередко – и гинецей с единственной семяпочкой. Существует несколько путей эволюционных преобразований морфологических признаков, приводящих к формированию гинецеев с одной семяпочкой, но не для всех таксономических групп они выявлены с достаточной надежностью. Особый интерес представляет группа семейств порядка Poales, включающая злаки, так как в ней, помимо злаков, односемянные плоды формировались независимо еще в нескольких таксонах. Мы рассматриваем эндемичное для юго-западной Австралии семейство Anarthriaceae, в котором у одного из трех родов (*Hopkinsia*) плоды односемянные, а у двух других – многосемянные, возникающие из тримерного синкарпного гинецея. Морфологическая природа гинецея *Hopkinsia* остается дискуссионной из-за недостаточной изученности группы. Материал по всем трем родам семейства собирали в природе и изучали путем изготовления серийных микротомных срезов.

Женский цветки *H. anoectocolea* имеют тримерный двухкруговой околоцветник, (каждый его филлом иннервируется одним пучком), три не васкуляризованных стаминодия и один плодолистик. В базальной зоне завязи расположены три проводящих пучка на радиусах наружных элементов околоцветника, акропетально происходит бифуркация одного из проводящих пучков в трансверсальной плоскости на равноценные пучки, каждый из которых затем сливается с ближайшим к нему пучку, не претерпевшему бифуркацию. В результате наблюдается два проводящих пучка, один из них является дорсомедианным пучком плодолистика, другой – вентральным. Положение единственного плодолистика варьирует между медианным и адаксиально-трансверсальным. Первый вариант более обычен. В женских цветках было также выявлено варьирование характера почкосложения.

Наши данные указывают на эволюционное возникновение гинецея *Hopkinsia* в результате уменьшения меризма (полной утраты двух плодолистиков). Гинецей *Hopkinsia*, в отличие от гинецея злаков, - мономерный, а не псевдомономерный. При этом мы выявили особый характер иннервации плодолистика *H. anoectocolea* по сравнению с родственными группами, который мы связываем с новым положением единственного плодолистика в центре цветка по сравнению с видами, имеющими тримерный гинецей. Нами впервые получены четко документированные данные об ориентации плодолистика *Hopkinsia*, которая оказалась более лабильной, чем у многих других Poales с односемянными плодами. Это стало возможным благодаря проведенному нами изучению структуры синфлоресценции, которое впервые позволило соотнести положение

плодолистика и кроющего листа цветка. В отличие от ряда авторов, мы считаем, что цветки *Hopkinsia* (как и у многих других Poales) собраны в колоски.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 14-14-00250).

Структура приростов у некоторых форм *Chamaecyparis pisifera*

Фролова Александра Валерьевна

Российский государственный аграрный университет –

МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва

Aleks-Sanechka@mail.ru

Объект изучения: типовая - *Chamaecyparis pisifera* и культивируемые формы - *Chamaecyparis pisifera 'Plumosa Aurea'*, *Chamaecyparis pisifera 'Squarrosa'*, *Chamaecyparis pisifera 'Squarrosa Intermedia'*.

Цель: выявить различия в структуре годичных приростов у разных форм *Chamaecyparis pisifera*.

Задачи: установить структуру годичных приростов; выяснить качественные отличия изучаемых форм по структуре приростов; провести анализ систем элементарных моноритмических побегов (СЭМП).

У форм '*Plumosa Aurea*', '*Squarrosa*', '*Squarrosa Intermedia*' дифференциация побегов невелика, вероятно, из-за этого направление роста и формирование кроны происходит более быстро, чем у типовой формы, у которой побеговая система более дифференцирована на ростовые и трофические побеги. У типовой формы и у формы '*Squarrosa*' приросты ветвятся до 4 порядка, а у форм '*Squarrosa Intermedia*' и '*Plumosa Aurea*' – до 5. Это подтверждается их внешним видом, побеги выглядят более густыми. По числу боковых силлептических побегов и числу метамеров между ними наибольшую однородность проявляет форма '*Squarrosa*'.

Сравнив наблюдения трёх лет, можно заметить, что интенсивность прироста в 2013 году была заметно выше. Возможно, это связано тем, что скорость роста у кипарисовиков с возрастом уменьшается. Высказано предположение о том, что боковые веточки высоких порядков ветвления прекращают свой рост и фактически выполняют функции листьев.

Элементарные побеговые системы могут формироваться за один сезон. На наш взгляд, это связано с силлептическим ветвлением до высоких (4-5) порядков в пределах СЭМП годичного прироста.

Выводы: - Общая структура годичного прироста в целом соответствует открытой системе ветвления. У типовой формы приросты на протяжении основной оси ветвятся регулярно, у культивируемых форм – неопределённо: интенсивность ветвления снижается по направлению к верхушке. Длина силлептических побегов у изучаемых форм уменьшается по направлению к верхушечной почке.

- Качественные отличия по структуре приростов не выявлены;

- СЭМП, а именно порядок ветвления, интенсивность ветвления, общая длина приростов жёстко не связаны с генотипом и типом листьев.

**Реконструкция процессов расселения и формирования ареалов
представителей семейства *Monimiaceae*: молекулярно-генетический и
морфологический анализ**

Юрманов Антон Алексеевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

yurmanov-anton.ya.ru@yandex.ru

Монимиевые (*Monimiaceae* Juss.) – семейство двудольных растений, входящее в порядок лавровые (*Laurales*). Семейство объединяет около 35 родов и не менее 250 видов, распространенных в тропиках и субтропиках, главным образом, Южного полушария. Объектом изучения данной работы является семейство монимиевые. Предметом изучения являются родственные связи между родами на основе молекулярно-генетических и морфологических данных и моделирование их расселения на основе палеоботанических данных. Методы: молекулярно-генетический анализ, широко практикуемы в биогеографических моделях. Цель работы – реконструкция процессов расселения представителей семейства монимиевые (*Monimiaceae*) на основе комплексного морфологического и молекулярно-генетического анализа.

Среди задач работы важнейшей было сравнение «молекулярно-генетической», «морфологической» и комплексной моделей расселения родов монимиевых и тестирование их (моделей) доступными палеоботаническими материалами.

Для анализа были выбраны 20 видов монимиевых из 18 родов, относящихся к двум подсемействам – *Hortonioioideae* и *Mollinedioideae*, в качестве внешней группы (*outgroup*) использован *Gyocarpus americanus* Jacq. из сестринского семейства *Hernandiaceae*. В результате работы была создана база данных, которая включает морфо-анатомические, и в частности, карпологические особенности исследованных видов монимиевых, на ее основе было построено филогенетическое древо («морфологическая кладограмма»). Также для выявления родственных связей внутри семейства применялся молекулярно-генетический метод, были использованы данные секвенирования молекулярной последовательности гена каждого вида (5.8S ribosomal RNA gene) и была построена «молекулярная кладограмма». Кроме этого, учитывались палеоботанические данные. Для достижения основной цели работы – реконструкции процессов расселения представителей семейства монимиевых на основе комплексного морфологического, молекулярно-генетического и палеоботанического анализа – для каждой из построенных кладограмм был разработан сценарий расселения представителей семейства. Наиболее адекватной палеоботаническим материалам (выполняющим функции тестирования) признана комплексная кладограмма, построенная по совокупности морфологических и молекулярно-генетических признаков. Согласно ей, можно строить предположение о том, что некоторые виды были в геологическом времени изолированы от других. Также имело место повторное заселение наиболее продвинутыми в экологическом отношении видами. Центрами разнообразия являются Австралия, Океания и острова юго-восточной Азии.

Умеют ли рдесты считать?

Табачник Алексей Константинович, Лукьянов Даниил Константинович

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

atabachnick@mail.ru.

Известно, что побеги многих однодольных четко упорядочены по структуре: число метамеров у однолетних генеративных побегов постоянно. Это явление было показано, например, на нескольких видах рода *Carex*.

Мы поставили перед собой задачу: узнать, детерминировано ли число междоузлий, которое образует рдест блестящий (*Potamogeton lucens*, Potamogetonaceae, Alismatales) между корневищем и верхушечным соцветием.

Сбор материала был проведен в июне 2015 г. в Москве-реке в окрестностях Звенигородской биологической станции МГУ (Одинцовский р-н Московской обл.). Изучены 4 изолированные группы *P. lucens*. Для 93 побегов каждой группы (то есть всего для 372 побегов) подсчитано число междоузлий от погруженного в грунт корневища до верхушечного соцветия. Предполагалось, что каждая такая группа рдеста представлена единственным вегетативным клоном. Для проверки этой гипотезы корневище откопали, чтобы убедиться, что оно соединяет все побеги.

Внутри каждого клона показана тенденция к образованию одного и того числа междоузлий. Это число составило 11, 16 и 12 метамеров, но оно может незначительно варьировать. Внутриклональное распределение числа междоузлий нормальное (JB-тест, $P > 0.05$), межклональные различия достоверны (t-тест, $P < 0.05$). Величина отклонения от среднего у каждого клона зависела от числа метамеров: чем больше междоузлий, тем сильнее отклонения от средней величины, рдест «считает хуже».

Четвертая группа по распределению метамеров отличалась от первых трех групп. Это объясняется гетерогенным составом группы, предположительно состоящей из двух или более рамет (у этой группы не было общего корневища для всех ее представителей, а распределение числа междоузлий в данной группе отличалось от нормального; JB-тест, $P < 0.05$).

Таким образом, число междоузлий между корневищем и соцветием у *P. lucens* в значительной степени генетически детерминировано. У представителей этого вида с разными генотипами количество междоузлий может существенно различаться: от 9 до 20. Следует отметить, что внешне однородные скопления рдеста могут быть представлены несколькими раметами с различными признаками.

ВИРУСОЛОГИЯ

Носительство вируса бычьего лейкоза и экспрессия гена *dicer* у крупного рогатого скота

Андрейченко Ирина Николаевна

Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Отдел молекулярных биотехнологий, Россия, Москва

Nikolavna.88@mail.ru

Мишенью ретровируса бычьего лейкоза (ВЛКРС) являются В-лимфоциты, у трети инфицированных животных наблюдается персистентный лимфоцитоз и менее чем у 5% развивается лимфосаркома, чаще в возрасте 4-8 лет. В литературе обсуждается определенный антагонизм между транскрипцией полноразмерной провирусной ДНК и провирусной микроРНК, вносящей основной вклад в неопластическую трансформацию инфицированных лимфоцитов. Для того, чтобы оценить согласованность транскрипции провирусной ДНК и микроРНК ВЛКРС, в настоящей работе выполнены следующие исследования. С использованием ранее разработанных праймеров к гену *pol* ВЛКРС среди черно-пестрого голштинизированного скота (20 голов, хозяйство «Можайское») выделены животные, несущие в своем геноме интегрированную провирусную ДНК ВЛКРС, и свободные от инфекции. На матрице тотальной РНК, выделенной из клеток крови, был проведен синтез первой цепи кДНК с использованием случайного декануклеотидного праймера Random(dN)₁₀. Качество полученной кДНК оценивали по амплификации гена рибосомального белка RPLP0.

Экспрессия гена *pol* была обнаружена у 30% коров, несущих в геноме встроенную провирусную ДНК, но не выявлялась ни у одного животного, свободного от инфекции. Детекция транскриптов гена *pol* свидетельствует об экспрессии в лимфоцитах соответствующих животных провирусной ДНК и размножении ВЛКРС. Далее на кДНК был выполнен анализ присутствия транскрипта гена *dicer* (ключевого фермента для формирования микроРНК) у животных, несущих встройку в геном провирусной ДНК ВЛКРС и у контрольной группы. Получены данные, свидетельствующие о том, что экспрессия гена *dicer* не совпадает с присутствием фрагмента гена *pol* ВЛКРС. Эти результаты согласуются с высказанным предположением о том, что активная транскрипция провирусной ДНК находится в определенном антагонизме с транскрипцией генов микроРНК ВЛКРС, выполняющей ключевую роль в неопластической трансформации лимфоцитов. Можно ожидать, что несмотря на гетерогенность лимфоцитов по инфицированности, размножению в них ВЛКРС, а также транскрипции генов микроРНК, именно преобладание клеток с активной транскрипцией генов микроРНК может служить прогнозом повышенной вероятности развития лейкоза у КРС.

Работа выполнена под руководством д.б.н. Г.Ю. Косовского, д.с.-х.н. В.И. Глазко, к.б.н. С.Н. Ковальчук.

Конструирование основы для онколитического аденовирусного вектора

Демидова Елена Валерьевна

Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,

Россия, Новосибирск

alfaelenaa@mail.ru

Проблема лечения рака не перестает быть актуальной, и одним из новых путей ее решения является онколитическая виротерапия, основанная на природном свойстве некоторых вирусов реплицироваться преимущественно в раковых клетках организма. Некоторые представители семейства *Adenoviridae* зарекомендовали себя как перспективные онколитики, в частности, аденовирус 6-го серотипа (Ад6). Цель данной работы – получение плазмиды, содержащей полный геном Ад6, для дальнейших генно-инженерных работ по конструированию штамма, обладающего более эффективными онколитическими свойствами по сравнению с исходным штаммом.

Для этого использовались различные вирусологические и молекулярно-биологические методы, главный из которых – проведение гомологичной рекомбинации в клетках *E.coli* BJ5183.

Сначала была получена плазида pBRAd путем встройки в pBR322 сайта рестрикции AsiSI, не встречающегося в геноме Ад6, для последующего вырезания полного генома из плазмиды. На основе pBRAd была сконструирована плазида pAdEnds со встроенными начальным и конечным фрагментами генома Ад6, при этом «внешние» концы фрагментов также были фланкированы сайтами AsiSI для вырезания. Для получения полногеномной плазмиды pAdEnds линейаризовали по уникальному сайту PsiI, разделяющему начальный и конечный фрагменты генома, затем ею котрансформировали клетки *E.coli* BJ5183 вместе с геномной ДНК Ад6. В результате прохождения гомологичной рекомбинации в данном штамме была получена плазида pAd6, содержащая полный геном Ад6, что было подтверждено рестрикционным анализом ДНК. Для подтверждения инфекционности ДНК провели вырезание копии геномной ДНК из pAd6 по сайтам AsiSI с последующей трансфекцией с липофектаминосом клеток Ad293. В результате «оживления» копии ДНК из pAd6 наблюдали типичное для аденовирусов цитопатическое действие. Последовательности всех конструкций были также проверены секвенированием.

Полученная плазида pAd6 инфекционна и пригодна для дальнейших работ по получению модифицированного аденовирусного штамма, обладающего повышенными онколитическими свойствами по сравнению с исходным штаммом. В дальнейшем планируется повышение опухолевой специфичности и усиление онколитического потенциала штамма путем модификации определенных районов плазмиды pAd6 с последующим «оживлением» вируса.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Новосибирского государственного университета в сфере научной деятельности (проект №2459).

Конструирование рекомбинантных белков на основе M2e пептида вируса гриппа, образующих наноразмерные частицы

Зыкова Анна Андреевна, Курриянов Виктор Васильевич

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Nuta2109@gmail.com

Наиболее эффективным способом предотвращения распространения гриппа является вакцинация. Основными антигенными белками вируса гриппа являются гемагглютинин и нейраминидаза, однако, их высокая изменчивость не позволяет на их основе создавать эффективные вакцины сразу против нескольких вирусных штаммов. Использование внеклеточного домена M2 белка (M2e), высоко консервативного у большинства штаммов вируса гриппа, как человека, так и животных, позволяет создать «универсальную» рекомбинантную вакцину.

Целью нашей работы было конструирование частиц на основе M2e пептида вируса гриппа человека и сравнение полученных рекомбинантных белков в способности образовывать наноразмерные частицы.

Все манипуляции с ДНК – клонирование последовательностей в плазмидные векторы, рестрикция, лигирование, секвенирование, и т.п., а также трансформацию клеток *E. coli* проводили согласно общепринятым методикам. Для экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E.coli* использовали векторы pQE30 и pQE60 (Qiagen). Очистку белков проводили на Ni-NTA-силикагеле (Promega). Полученные препараты анализировали методами электрофореза в нативных и денатурирующих условиях и с помощью атомно-силовой микроскопии.

Мы сконструировали гены, кодирующие рекомбинантные белки, включающие четыре и восемь повторов последовательностей M2e пептида «человеческого» вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в сочетании со спираль-образующими линкерами, фланкирующими эти последовательности. Эти гибридные белки были экспрессированы в клетках *E.coli*. Наличие 6-ти гистидинов и гибкого глицинового линкера на N –конце позволило быстро очистить рекомбинантные белки из клеточного лизата, используя металл-аффинную хроматографию. Полученные рекомбинантные белки были способны образовывать частицы в зависимости от наличия спиральных линкеров на N- и C- концах молекулы. С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что размер частиц зависит от того, находится этот линкер на одном или обоих концах молекулы рекомбинантного белка. Кроме того, наличие спиральных линкеров с обеих сторон вставки обеспечивало большую устойчивость белка к протеолизу.

Таким образом, введение спиральных линкеров влияет на способность рекомбинантного белка агрегировать, что повышает его стабильность и протеолитическую устойчивость. Эти свойства могут повысить эффективность вакцин на основе белковых наночастиц, так как, известно, что иммуногенность рекомбинантного белка зависит от количества повторов антигенных эпитопов и от способности белка агрегировать с образованием наноразмерных частиц.

**Разработка универсального подхода создания диагностикумов ретровирусов
животных и насекомых**

Калашников Александр Евгеньевич¹, Богомолов Артем Игоревич²

*¹Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства
имени Академика Л.К. Эрнста, Россия, Дубровицы*

*²Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
имени К.И. Скрябина, Россия, Москва
aekalashnikov@yandex.ru*

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV) и ретровирусы пчел высоко изменчивы, вызывают гибель с.х.-животных и могут в скрытой форме распространяться на обширных территориях. Для эффективной борьбы с инфекцией необходимо разрабатывать современные методы диагностики. Диагностика классическими методами: реакцией иммунодиффузии, иммунно-ферментным анализом - не может обеспечить достаточной диагностической и аналитической чувствительности. Были поставлены задачи анализа кинетики мутаций разработки ПЦР теста нового поколения. Праймеры подобраны по статически консервативным областям на основании данных метагеномного анализа при сравнении максимального количества известных изолятов BLV (>1009) и вирусов мешотчатого расплода, черных маточников, медленного паралича, Кашмирского вируса, острого паралича, хронического паралича, израильского вируса острого паралича (>850). Проведен анализ с учетом областей высокой кинетики мутаций наиболее географически и структурно подразделенных друг от друга изолятов, что позволит в дальнейшем предсказывать структуру генома новых неизвестных изолятов, привнесенных на территорию России при импорте крупного рогатого скота и пчел. Также были подобраны флуоресцентные зонды, рассчитанных по системе Taqman (Applied Biosystems, США) и Sybr Green (New England Biolabs, Англия). Температура отжига, длина продукта и время элонгации подобраны таким образом, чтобы проводить амплификацию в единых условиях. Тест эффективно выявлял образцы по референтному гену с концентрацией гДНК от 5 до 120 мкг/мкл и разбавлении до 2048 раз (конечная концентрация 0,035 мкг/мкл). Всего было проанализировано 345 животных крупного рогатого скота из хозяйств Московской области с интактными животными и 30 рабочих пчел из 10 семей инфицированных пасек Рязанской области, из них выявлено от 29 до 80% положительных особей. Тест эффективнее разработанной ранее гнездовой ПЦР, и теста для выявления вирусов пчел (данные COLOSS) которые выявляли от 20-40% положительных особей. Анализ наличия вирусной РНК позволяет выявлять больше инфицированных животных при сравнении с анализом провирусной ДНК с большей достоверностью (100% против 84,6% для крупного рогатого скота и 70 против 30% для пчел). Среди преимуществ метода следует отметить его универсальность и высокую эффективность на практике при тестировании на образцах животных и пчел.

Изучение иммуногенных свойств препарата псевдовирусных частиц белка L1 вируса папилломы человека 16 типа

Орлова Полина Александровна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики,
Россия, Москва
p.orlova88@gmail.com*

На сегодняшний день доказано, что вирус папилломы человека 16 типа (ВПЧ16) играет важную роль в развитии рака шейки матки и опухолей области головы и шеи. Действенной мерой для предотвращения инфекции ВПЧ16 и других типов вируса является профилактическая вакцинация. Применяемые на сегодняшний день анти-ВПЧ вакцины «Гардасил», «Гардасил-9» и «Церварикс» основаны на использовании псевдовирусных частиц (ПВЧ), формируемых белком вирусного капсида L1. Учитывая угрозу ВПЧ инфекции, очевидна целесообразность создания отечественного аналога существующих вакцин против папилломавирусной инфекции.

Изучение иммуногенных свойств препарата раннее полученного нами белка L1, собранного в ПВЧ, проводили на мышах линии Balb/c. В работе было задействовано 8 групп по 5 животных в каждой, различавшихся по количеству вводимого антигена и присутствию адъювантов (геля гидрата окиси алюминия и/или монофосфорил липида A1 из *Salmonella enterica* - MPLA). Иммунизацию проводили 3 раза с интервалом в две недели, затем через неделю у животных отбирали кровь и проводили резекцию селезенки с выделением спленоцитов для определения клеточного иммунного ответа. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными и в соответствии с санитарными правилами для вивария.

Иммуногенные свойства полученного нами препарата белка L1 в виде ПВЧ были оценены по количеству интерферона-гамма, секретируемого стимулированными спленоцитами, а также по титру специфических антител. Наилучшие результаты были получены в группах животных, иммунизированных белком L1 с обоими адъювантами.

Изменение локализации гликопротеина вируса бешенства за счет добавления последовательностей белков NS1 и CTLA4

Панкова Екатерина Олеговна¹, Латанова Анастасия Александровна²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

*²ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
Россия, Москва*

79153645941@ya.ru, aalatanova@gmail.com

Несмотря на то что заболевание бешенства известно человеку более 4000 лет, данное заболевание до сих пор остается неизлечимым и представляет большую опасность для человека и животных, так как единственным надежным способом защиты является своевременная постэкспозиционная вакцинация. Используемые на сегодняшний день вакцинные препараты представляют собой инактивированный вирус и являются не оптимальными с медицинской и экономической точки зрения, что ставит вопрос о создании более эффективных вакцин нового поколения, наиболее перспективными среди которых считаются ДНК-вакцины. Этот подход к созданию вакцин позволяет различным

образом модифицировать вакцинный вирусный антиген и регулировать тем самым иммунный ответ.

В данной работе была создана плаزمида, кодирующая модифицированный гликопротеин вируса бешенства с сигналами секреции и узнавания антиген-презентирующими клетками. Уровень экспрессии белка был протестирован в культуре клеток HeLa с помощью метода Вестерн блот, его локализация была определена иммуноокрашиванием клеток. Кроме того, был оценен уровень внутриклеточной деградации белков протеазами.

Создана плазмида для экспрессии в клетках млекопитающих гликопротеина вируса бешенства, несущего сигнал секреции белка NS1 и домен узнавания антиген-презентирующими клетками - CTLA4. В клетках, трансфицированных данной плазмидой с помощью Вестерн блот был детектирован модифицированный белок. Иммунокрашивание трансфицированных клеток показало изменение внутриклеточной локализации модифицированного белка. Белок локализуется в ЭПР, комплексе Гольджи и на поверхности клеток. Было показано, что белок практически не подвергается деградации протеасомами и лизосомными протеазами.

Таким образом, получен гликопротеин вируса бешенства, который направляется в ЭПР, комплекс Гольджи, и на поверхность клетки. За счет сигнала NS1 данный белок способен секретироваться. Наличие домена CTLA4 должно повысить активацию антиген-презентирующих клеток и улучшить иммунный ответ, что будет проверено в последующих экспериментах на мышах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.604.21.0109 от 7 августа 2014 г., RFMEFI60414X0109).

Выбор оптимальной ОТ-ПЦР тест-системы для детекции вирусов рода *Flavivirus*

Полиенко Александра Евгеньевна

*ФГБНУ ИПВЭ имени М.П. Чумакова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА
имени К.И. Скрыбина, Россия, Москва
polienko.ae@yandex.ru*

Среди патогенных для человека представителей рода *Flavivirus* следует отметить вирусы Денге, Западного Нила, желтой лихорадки, энцефалита Сент-Луи, японского и клещевого энцефалитов и другие.

Особенностью рода *Flavivirus* являются антигенные перекресты между вирусами, что значительно затрудняет дифференциальную диагностику на основе серологических реакций. Целью данной работы был выбор универсальной тест-системы, основанной на реакции ОТ-ПЦР, для детекции как изученных, так и неохарактеризованных флавивирусов.

В работе были использованы олигонуклеотидные праймеры, как сконструированные для выполнения цели данной работы, так и ранее описанные в литературе.

Оценка комбинаций праймеров проводилась с использованием кДНК 10 охарактеризованных флавивирусов. В качестве отрицательных контролей была использована кДНК представителей других родов семейства *Flaviviridae* (*Hepacvirus*,

Pestivirus) и 8 арбовирусов из семейств *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Ortomixoviridae*, *Reoviridae*. Наиболее высокой чувствительностью и достаточной специфичностью по сравнению со всеми апробированными вариантами обладала система детекции, разработанная Scaramozzino et al.(2001), которая позволяет детектировать фрагмент последовательности, кодирующей белок NS5, являющийся РНК-зависимой РНК-полимеразой.

Эта тест-система была использована для обследования полевого материала. Всего было исследовано 1993 комара (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*), 40 кровососки (*Lipoptena*), 10 слепней (*Tabanus*), 722 клеща (*Dermacentor*, *Ixodes*), объединенных в 381 пул.

Были обнаружены по одному положительному пулу комаров *Aedes communis* и *Aedes cinereus*, собранных в республике Карелия и г. Санкт-Петербург, а также 8 пулов клещей *Ixodes persulcatus*, собранных в Челябинской области.

Последовательности, обнаруженной в комарах из республики Карелия, присвоено название Kondopoga. На основании филогенетического анализа сделан вывод о её принадлежности к группе Insect-Specific вирусов рода *Flavivirus*.

В комарах, собранных в Санкт-Петербурге, был обнаружен флавивирус Lammi, который был выделен из комаров *Aedes cinereus* в Финляндии.

Группе последовательностей, детектированных в Челябинской области, было присвоено название Miass, показавшим наибольшее сходство с фрагментом флавиподобного гена NS5 вируса Jingmen tick, выделенного из клещей *Rhipicephalus microplus*, собранных в Китае. Jingmen tick имеет сегментированный геном, не характерный для флавивирусов.

Таким образом, с помощью данной тест-системы нами показана возможность детектировать как известные, так и новые неохарактеризованные вирусы.

Исследование фармакокинетики препаратов бактериофага *Escherichia coli* G7C в организме пятнистого зублефара (*Eublepharis macularius*)

Попов Алексей Алексеевич
СУНЦ МГУ, Россия, Москва
PopA_5_1@mail.ru

Ведётся поиск новых методик борьбы с бактериями, одна из них – фаговая терапия – процесс лизиса бактериальных колоний вирусными частицами. Наша работа направлена на изучение причин, от которых зависит длительность циркуляции фагов в крови животных и на выведение штамма, способного циркулировать более длительно, чем G7Cv1.

Для нашего исследования мы использовали бактериофаг G7C рода *N4likevirus*, бактерию *Escherichia coli* и геккона *Eublepharis macularius*. Методика работы: титрование образцов бактериофага (двуслойным методом), инъекция раствора с концентрацией 10^8 БОЕ/мл в кровь геккона, взятие крови из хвостовой вены через некоторые промежутки времени, высеивание её на газон чувствительной культуры, отбор и воспроизведение фага с крайних точек (действия повторялись несколько раз).

Мы выяснили, что кинетика препаратов бактериофагов в крови гекконов имеет некоторые особенности. Имеется зависимость скорости элиминации от температуры тела животного. В животных, содержащихся при 20°C бактериофаг циркулирует длительно,

чем в животных содержащихся при 35°C. Также немаловажной причиной увеличения скорости элиминации бактериофагов может служить иммунизация гекконов концентрированными фаговыми препаратами. В ходе работы нам удалось вывести два штамма бактериофагов, эволюционирующих разными путями. Один из штаммов (G7Cvn.1) в первые часы быстро уменьшает свою численность, однако вскоре скорость его элиминации падает. Второй штамм (G7Cvn.2) просто медленнее элиминирует. Также в результате большого количества повторений эксперимента нам удалось добиться того, что длительность циркуляции G7Cv3 (последняя версия) увеличилась в 6 раз в сравнении с бактериофагом G7Cv2 (первая версия), длительность циркуляции которого составляла 8 часов.

Используя методику отбора наиболее длительно циркулирующих мутантов бактериофагов, нам удалось вывести штамм, полностью элиминирующий из крови лишь спустя 48 часов. Это доказывает возможность выведения бактериофагов, удовлетворяющих человеческим целям. Причины этого явления не совсем ясны, поэтому требуется генетический анализ бактериофагов G7Cv3. Также мы смогли выявить некоторые физиологические закономерности, влияющие на скорость элиминации бактериофага из крови рептилий.

Изучение механизмов взаимодействия белка 3CD полиовируса с регуляторным элементом генома

Смертина Елена Ивановна

ФГБНУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов

имени М. П. Чумакова, Москва

l-smertina@mail.ru

Вирус полиомиелита является представителем семейства *Picornaviridae*, род *Enterovirus*. Для инициации репликации, одного из этапов цикла репродукции вируса, необходимо взаимодействие вирусного белка 3CD и регуляторного элемента генома *oriL*. Неизвестно, каким образом образуется комплекс и как он способствует инициации репликации. Показано, что со стороны 3CD во взаимодействие с *oriL* вовлечен аминокислотный триплет ${}_{154}\text{TGK}_{156}$. Чтобы определить свойства триплета ${}_{154}\text{TGK}_{156}$, обеспечивающие взаимодействие с *oriL*, получены десять мутантов с различными заменами в положениях 154 и 156.

Анализ фенотипа и удельной инфекционности был проведен методом бляшек в культуре перевиваемых клеток Vero, для оценки взаимодействия *oriL* и рекомбинантного 3CD использовали метод EMSA. Кинетика накопления вирусной РНК была изучена в культуре перевиваемых клеток *Vero*.

Варианты, содержащие гидрофобную аминокислоту в положении 154 и Lys в положении 156 (${}_{154}\text{VGK}_{156}$, ${}_{154}\text{IGK}_{156}$), а также вариант, содержащий Arg в положении 156 (${}_{154}\text{TGR}_{156}$) не отличались от вируса дикого типа во всех экспериментах. Вариант, содержащий неполярную аминокислоту Cys в положении 154 (${}_{154}\text{CGK}_{156}$), продемонстрировал фенотип и эффективность синтеза дочерних РНК сходные с вирусом дикого типа, но соответствующий рекомбинантный белок в наших условиях не взаимодействовал с *oriL*.

Мутанты без положительно заряженной аминокислоты в исследуемом триплете (${}_{154}\text{TGM}_{156}$, ${}_{154}\text{TGS}_{156}$) и мутанты с аминокислотами Ser или Met в положении 154

(¹⁵⁴SGK₁₅₆, ¹⁵⁴MGR₁₅₆), оказались неспособны к эффективной репродукции и репликации, а соответствующие рекомбинантные ЗСД не взаимодействовали с *oriL*.

Псевдоревертанты вариантов с триплетами ¹⁵⁴TGM₁₅₆ и ¹⁵⁴TGS₁₅₆ приобрели положительно заряженную аминокислоту в положении 153 (¹⁵³RTGM₁₅₆ и ¹⁵³RTGS₁₅₆). Эти последовательности были реконструированы в контексте генома дикого типа. Однако полученные геномы лишь незначительно улучшали фенотип по сравнению с вариантами без положительно заряженной аминокислоты и соответствующие рекомбинантные ЗСД практически не связывались с *oriL*.

Для эффективной репродукции вируса в 154 положении белка ЗСД должна быть аминокислота с гамма-метильной или сульфгидрильной группой. В районе триплета ¹⁵⁴TGK₁₅₆ необходима положительно заряженная аминокислота, но ее перемещение в положение 153 недостаточно для компенсации отсутствия положительного заряда в положении 156.

Особенности генетической структуры русской верховой породы лошадей по ISSR и IRAP маркерам

Алижанов Махач Касимпашаевич

Российский государственный аграрный университет – МСХА

имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва

maxiach@mail.ru

За последнее время разработано достаточно большое количество полиморфных маркеров и тест-систем для выявления особенностей генетической структуры пород лошадей. В геноме *Equus caballus* описано множество микросателлитных локусов, однако, обычно для генотипирования используют только 14-20 из них. Эти локусы высокополиморфны и локализованы на разных хромосомах. Для генотипирования лошадей разрабатываются методики одновременного учета множества локусов, так, например, охарактеризовано более 50000 однонуклеотидных замен – SNP (Illumina equine SNP50 beadchip) и созданы чипы для их определения. Тем не менее, большинство из этих методик достаточно дороги, поэтому, целесообразно разрабатывать более дешевые полиморфные тест-системы для одновременного определения аллельного статуса множества геномных локусов лошадей. Для решения задач мониторинга и управления генетическими ресурсами местных и спортивных пород лошадей необходим подбор генетических элементов, удобных для полилокусного генотипирования и определения «генофондного стандарта» пород, генетической структуры помесных и улучшенных групп животных. В этих целях широкое распространение для полилокусного генотипирования различных видов сельскохозяйственных животных и растений («геномного сканирования») получило использование ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) и IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) маркеров. В настоящем исследовании проведено генотипирование русской верховой породы лошадей. С помощью полилокусных ISSR и IRAP маркеров определены характерные для данной породы генотипы. Было произведено сравнение данных полиморфизма используемых маркеров с ранее полученными результатами на следующих породах: алтайской, карачаевской, рысистых породах (орловская рысистая, русская рысистая, американская стандартbredная). У сравниваемых групп лошадей по ISSR-PCR методу получено более 50 достоверно воспроизводимых локусов, по методу IRAP-PCR – более 20, что позволило найти достаточное количество породоспецифичных маркеров. Полученные в исследовании данные в дальнейшем могут быть использованы базового материала при создании генофондного стандарта русской верховой породы.

Выражаю благодарность своему научному руководителю д.с.-х. наук, проф. Глазко Валерию Ивановичу за помощь в выполнении исследования.

Роль полиморфизма некодирующей РНК гена *MIR-22* (rs6502892) в патогенезе мигрени и тревожных расстройств

***Анучина А.А.¹, Скоробогатых К.В.², Сергеев А.В.^{2,3}, Кондратьева Н.С.¹,
Афончикова Е.В.¹***

¹*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва*

²*Университетская клиника головной боли, Москва*

³*Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова, Москва
arinate@mail.ru*

Мигрень является широко распространенным неврологическим заболеванием, проявляющимся в периодических приступах пульсирующей головной боли, занимает 3-е место в числе самых распространенных заболеваний среди мужчин и женщин в мире, а также 7 место среди специфических причин нетрудоспособности. В России цифры распространенности мигрени превышают мировые показатели почти в 1,5-2 раза – 20.3%, а ежегодные косвенные расходы (потеря дней трудоспособности) по причине первичных головных болей составляют 22.8 млрд долларов США (1,75% от валового внутреннего продукта России) [4].

Паническое расстройство (ПР) – это заболевание, характеризующееся спонтанным возникновением панических атак (ПА), а также боязнью их возникновения в межприступном периоде. Распространенность ПР в мире составляет от 2 до 5 процентов [1]. Без принятия соответствующих мер по лечению ПР может привести к инвалидизации больного [3]. Финансовые потери по причине тревожных расстройств в мире составляют 31% от расходов, приходящихся на психические заболевания, а на лечение пациентов с тревожными расстройствами уходит в два раза больше средств, чем на лечение больных с соматическими заболеваниями [2].

Целью работы являлось выявление ассоциации с мигренью и ПР для полиморфных вариантов гена *MIR-22* (rs6502892). Для достижения цели использовались методы ПЦР в реальном времени и ПЦР-ПДРФ.

В конечном итоге нами были выявлены ассоциации замены rs6502892 с мигренью ($\chi^2=6.99$, $p=0.008$), в частности, с мигренью без ауры ($\chi^2=3.76$, $p=0.05$) и с хронической мигренью ($\chi^2=4.63$, $p=0.03$, причем носительство аллеля *MIR-22:C* повышает риск развития заболевания в 2 раза), а также с паническим расстройством ($\chi^2=13.20$, $p=0.001$, аллель *MIR-22:C* повышает риск развития заболевания в 4 раза).

Таким образом, патогенез обоих заболеваний контролируется одними и теми же факторами, что указывает на тесную взаимосвязь между мигренью и паническим расстройством. К тому же, ассоциация с хронической мигренью и отсутствие ее для эпизодической указывает на возможное участие *MIR-22* в хронификации приступов эпизодической мигрени.

Генное окружение ДНК транспозонов хелитронов в геномах *Bos taurus*

Бабий Анна Владимировна

Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий,

Россия, Москва

anna.babii@yahoo.com

В целях решения актуальных задач сельскохозяйственных биотехнологий необходим подбор наиболее информативных ДНК-маркеров для полилокусного генотипирования – высокополиморфных геномных элементов, полиморфизм которых может быть ассоциирован с фенотипической изменчивостью. В этой связи, особый интерес представляют такие высоко мобильные генетические элементы, как ДНК транспозоны суперсемейства хелитронов (из англ. *helitrons*). Выбор последовательностей хелитронов в качестве новых ДНК-маркеров обусловлен их широкой представленностью в геномах млекопитающих (от 2% до 5% от всего генома), высокой степенью полиморфности и их существенной ролью в геномных перестройках, что в свою очередь предопределяет как проявление конкретных фенотипических признаков, так и общий адаптивный потенциал организма в конкретных эколого-географических условиях.

Ранее нами было показана перспективность использования идентификационной нуклеотидной последовательности хелитронов для оценки консолидированности разных пород крупного рогатого скота (КРС). С целью исследования контекстных особенностей участков ДНК, фланкированного консенсусной последовательностью 3'-конца хелитронов *Heligloria* в геноме *Bos taurus*, проведено пиросеквенирование таких участков (длиной 520 п.н.), выявленных в результате геномного сканирования в геномах трех пород КРС: Айрширской и Калмыцкой пород и черно-пестрого голштинизированного скота.

В результате идентификации в системе BLASTn секвенированных фрагментов ДНК, фланкированных 3'-концом идентификационного участка хелитрона, было выявлена идентичность к 14 генам. Определение принадлежности данных генов к различным функциональным группам с помощью баз данных GeneCards и UniProt показало, что, в основном, это гены, участвующие в процессах передачи внутри- или межклеточных сигналов. В целях определения принадлежности выявленных генов к различным биологическим процессам и метаболическим путям, а также их совместное участие и/или возможность взаимодействия, использовались ресурсы PANTHER и GeneMANIA. Показано совместное участие 10 идентифицированных генов в процессах, связанных с иммунным ответом организма. Примечательно, что в 6 из 14 выявленных генов, участки, фланкированные хелитронами, попадают в кодирующие части генов, либо находятся на границе между экзоном и некодирующими участками (интронами или 5'-UTR), а также содержат мононуклеотидные замены SNP (синонимичные и несинонимичные), при сравнении с соответствующими референсными последовательностями в базе данных Gene. Поскольку известно, что секвенированные геномы человека и КРС существенно отличаются по избыточным дупликациям у КРС генов, продукты которых связаны с функциями иммунной системы, можно ожидать, что в их ускоренной эволюции принимают участие транспозиции ДНК транспозона хелитрона.

**Изучение роли SNP-мутаций в функционировании генов *varC37*, *varC38*,
varC40 систем токсин-антитоксин *Mycobacterium tuberculosis***

Белай Юлия Олеговна, Зайчикова Марина Викторовна

Лаборатория генетики микроорганизмов отдела генетических основ
биотехнологии Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва
iogen@vigg.ru

Туберкулез принадлежит к числу наиболее распространённых в мире инфекционных заболеваний человека, основным возбудителем которого является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, преимущественно поражающая легкие, реже – другие органы. Одной из особенностей возбудителя туберкулеза, затрудняющей лечение данного заболевания, является способность к переходу в покоящееся, персистирующее состояние. Бактерии, находящиеся в персистирующем состоянии, не подвержены действию антибиотиков. Персистенция в значительной мере обусловлена функционированием систем токсин-антитоксин (ТА). Системы ТА – это модули генов, расположенные в хромосомах (в случае *M. tuberculosis*) или плаزمиде, обычно состоящие из двух генов, один из которых кодирует белок, останавливающий рост клеток либо приводящий к их гибели (токсин), второй ген кодирует белок (антитоксин), нейтрализующий действие токсина. Значительная часть токсинов по механизму действия являются РНКазами.

Цель работы - изучить влияние мутаций в генах токсинов на активность белков-токсинов. Основная задача - изучение сравнительной рибонуклеазной активности белков-токсинов дикого типа и содержащих мутации.

В работе исследовались следующие гены-токсины систем ТА: *varC37*, *varC38*, *varC40*. С помощью биоинформатического анализа в данных генах у штаммов пекинского генотипа *M. tuberculosis*, являющегося наиболее опасным в эпидемиологическом отношении, ранее были выявлены мутации, потенциально способные влиять на свойства белка-продукта. Гены токсинов *varC37*, *varC38*, *varC40* дикого типа и содержащие исследуемые мутации были клонированы в составе экспрессионного вектора рЕТ32а в клетки *E. Coli*.

В результате осуществлено выделение и определение сравнительной рибонуклеазной активности белков VarC37, VarC38, VarC40 дикого типа и содержащих мутации. Отработана методика выделения белков. В некоторых случаях были выявлены слабые изменения рибонуклеазной активности мутантных белков в сравнении с белками дикого типа.

Полученные результаты подтверждают предположение о возможном влиянии мутаций на рибонуклеазную активность белков-токсинов. Однако для подтверждения результатов необходимо дальнейшее изучение влияния мутаций на активность продуктов исследуемых генов.

**Генетический скрининг на носительство 3-М синдрома в якутской популяции
Васильева Сайына Николаевна, Каймонов В.С., Гурьева П.И.**

ФГАОУ ВПО «СВФУ имени М.К. Аммосова»

*Учебно-научная лаборатория «Геномная медицина» Клиники Медицинского института,
Россия, Якутск
vsaina@yandex.ru*

3-М синдром – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, сопровождающееся низкорослостью, названное в честь трех авторов (Miller, McKusick, Malvaux), впервые описавших его в 1975 г., характеризующееся лицевыми дизморфиями пре- и постнатальной гипоплазией и рентгенологическими изменениями в костях (утончение длинных трубчатых костей и укорочение в переднезаднем направлении тел позвонков). В мировой литературе описано всего около 50 клинических случаев этого редкого заболевания в различных популяциях мира, частота гена неизвестна, ген CUL7 (Куллин 7), вызывающий это заболевание, был картирован и идентифицирован сравнительно недавно группой ученых из нескольких стран мира. Описано 25 различных мутаций в гене CUL7 у больных из 29 семей из различных стран мира, разной этнической принадлежности.

Целью научной работы являются скрининг на носительство 3-М синдрома в якутской популяции.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК (N=246), взятые из банка ДНК УНЛ «Геномная медицина» клиники МИ СВФУ с письменного информированного согласия пациентов, выборка образцов для исследования производилась путем выбора случайных проб с заведомо неизвестным наличием или отсутствием мутантного гена. Работа выполнялась на базе УНЛ «Геномная медицина» клиники МИ СВФУ в период с февраля по май 2015 года, амплификация областей генов, содержащих мутантные аллели, осуществлялась методом ПЦР с последующей рестрикцией Hinf I (Fermentas), результаты амплификации оценивали в гельдокументирующей системе, в 3% агарозном геле.

Всего было исследовано 246 образцов ДНК. Распределение по полу: мужчин было 71 (28.8%), женщин 175 (71.1%). В результате из 246 обследованных было выявлено 9 гетерозигот носителей гена 3-М синдрома (3,65%). Из них 3 мужчин (1.21%), 6 женщин (2,43%).

Выводы: в результате проделанной работы было установлено, что из 246 обследованных 3,65% являются носителями мутации в гене, ответственном за возникновение 3-М синдрома. Данный факт показывает высокий процент носительства 3-М синдрома среди якутской популяции.

**Определение клонального разнообразия в популяциях партеногенетического
вида ящериц *Darevskia unisexualis* на основе микросателлитного
генотипирования**

Гирнык Анастасия Евгеньевна

*Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН), Россия, Москва
nasstenochka@mail.ru*

Клонально размножающиеся позвоночные представляют особый интерес, так как при размножении у них отсутствует генетическая рекомбинация. Одними из таких видов являются партеногенетические кавказские скальные ящерицы рода *Darevskia*.

Для оценки клонального разнообразия был использован метод микросателлитного генотипирования. С помощью монолокусной ПЦР был проведен анализ аллельного полиморфизма трёх микросателлитных локусов (Du215, Du281, Du323) в популяциях *D. unisexualis* (68 особей, 5 популяций Армении). Полученные ПЦР-продукты были клонированы и секвенированы.

Было показано, что все исследованные особи гетерозиготны по исследованным локусам. Установлено, что изучаемые локусы (за исключением локуса Du323) являются полиморфными и представлены в популяциях несколькими аллельными вариантами, отличающимися друг от друга не только структурой и составом микросателлитного кластера, но и различным количеством однонуклеотидных вариаций (транзиции и трансверсии), расположенных на фиксированных расстояниях от кластера. При этом такие вариации образуют различные сочетания – гаплотипы, характерные для определенных аллелей. Показано, что изученные популяции отличаются между собой по частоте встречаемости аллельных вариантов исследованных локусов. По сочетанию аллелей каждого локуса был составлен генотип для каждой особи партеновида *D. unisexualis*. На основании этих данных детектировано 7 клональных линий, в том числе 4 мажорных и 3 минорных клон. Все клоны, кроме одного мажорного, который широко распространен в разных популяциях, географически ограничены.

Данный подход позволил определить число клональных линий у *D. unisexualis* и детектировать клоны, возникшие в результате межвидовой гибридизации и клоны постмутационного происхождения. Использование новых локусов для генотипирования должно дать новую информацию по клональному разнообразию партеновида *D. unisexualis*. Полученные данные могут быть использованы для определения филогенетических связей в группе ящериц рода *Darevskia* и генетического вклада отдельных популяций в генофонд *D. unisexualis*.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 14-14-00832.

Отклонения в гаметогенезе обеспечивают воспроизводство межвидовых гибридов в комплексе зеленых лягушек *Pelophylax esculentus*

Дедух Дмитрий Викторович

Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

dmitrov89@yandex.ru

Видообразование посредством гибридизации у животных связано с возникновением межвидовых гибридов, которые могут выживать и воспроизводиться благодаря изменениям гаметогенеза. Эти изменения включают избирательную элиминацию одного родительского генома и/или эндоредупликацию другого родительского генома в клетках зародышевой линии гибрида. Кроме того, особенности гаметогенеза гибридов способствуют возникновению полиплоидных животных. Удобной моделью для изучения механизмов и роли элиминации и эндоредупликации геномов в гаметогенезе гибридных животных является комплекс средневропейских зеленых лягушек. Этот комплекс включает два родительских вида – озерную лягушку *P. ridibundus* (геномная композиция RR, $2n=26$) и прудовую лягушку *P. lessonae* (геномная композиция LL, $2n=26$), - а также их естественную гибридную форму – съедобную лягушку (*P. esculentus*), представленную диплоидными (RL, $2n=26$) и двумя формами триплоидных гибридов (RRL и LLR, $3n=39$). Для того чтобы охарактеризовать процессы элиминации и

эндорепликации геномов в ходе гаметогенеза гибридных лягушек, мы провели анализ кариотипов ооцитов ди- и триплоидных самок *P. esculentus*. Мы обнаружили, что триплоидные гибриды формируют ооциты с 13 бивалентами, которые возникают в результате элиминации генома, представленного одной копией, без этапа эндорепликации. У большинства диплоидных гибридов ооциты с 13 бивалентами формируются в результате элиминации генома *P. lessonae* и эндорепликации генома *P. ridibundus*. Отсутствие элиминации и раунд эндорепликации приводят к возникновению ооцитов с геномной композицией, идентичной двукратному геному соматических клеток. Чтобы определить роль гибридных лягушек в возникновении ди- и триплоидных гибридов в популяционных системах мы провели идентификацию кариотипов головастиков, полученных от лабораторных скрещиваний гибридных животных. Мы установили, что триплоидные гибриды не способны самостоятельно воспроизводиться в популяционных системах и зависят от диплоидных гибридных самок, производящих диплоидные яйцеклетки. Чтобы обнаружить элиминацию генома в раннем гаметогенезе у гибридных животных, мы проанализировали гонады головастиков. В цитоплазме зародышевых клеток гибридных головастиков мы обнаружили хроматин-позитивные тельца (микроядра), которые предположительно содержат элиминируемый геном. Таким образом, процессы элиминации и эндорепликации геномов, происходящие в гаметогенезе гибридных животных, позволяют формировать фертильные гаметы, что необходимо для возникновения и воспроизводства гибридных животных различной ploidy.

Выражаю благодарность научному руководителю А. В. Красиковой

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров «Научного парка» СПбГУ: ЦКП «Хромас», Обсерватория экологической безопасности. Работа поддержана грантом РФФИ № 15-34-21020.

Исследование полиморфизма генов репарации днк и биотрансформации ксенобиотиков в популяциях Тоболо-иртышских тюменских татар

Долинина Д.О. Толстикова А.В.

*ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»,
биологический факультет, Россия, Кемерово
dolinina_1993@mail.ru, tolstikova.alina@inbox.ru*

Исследован полиморфизм генов репарации ДНК (LIG4*rs1805389, NBS1*rs1805794, ATM*rs1801516) и биотрансформации ксенобиотиков (ADH1B*rs1229984, ALDH2*rs671) в популяциях тоболо-иртышских сибирских татар Тюменской области. Выборка сформирована из татар, относящихся к тюменско-туринской группе – бухарцы и ялutorовцы. Выбор локальных популяций определен их территориальной близостью к крупному промышленному центру – г. Тюмени, так как известно, что особенности характера распределения аллельных вариантов генов изученной панели могут обуславливать отличия в чувствительности к средовым факторам в популяциях человека и, как следствие, к различиям в структуре и уровне заболеваемости.

Суммарный объем выборки составил 200 человек: татары-бухарцы (100 чел.), ялutorовские татары (100 чел.). ДНК из образцов выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование осуществляли методом аллель-специфической ПЦР. По результатам генотипирования рассчитывали генотипические и

аллельные частоты, а также оценивали показатели генетического разнообразия в популяции.

Сравнительный анализ показал, что частота аллеля LIG4*Т у татар-бухарцев (0,245) превышает таковую у ялutorовских татар (0,110). Похожая ситуация сложилась в отношении гена ALDH2* rs671. У татар-бухарцев частота аллеля ALDH2*А оказалась достоверно выше (0,129), чем у татар ялutorовской подгруппы (0,039). Выявленные различия свидетельствуют об особенностях популяционно-генетической структуры исследованных подгрупп тюменско-туринских татар, что может являться следствием этногенеза при участии разных этнических компонентов. Если говорить о частоте аллелей генов NBS1*С, АТМ*А, АДН1В*А, то статистически значимых различий при сравнении двух подгрупп татар тюменско-туринской группы выявлено не было. Анализ уровня гетерозиготности показал, что по всем пяти исследованным генетическим маркерам в обеих популяциях тюменско-туринских татар наблюдается отклонение от состояния равновесия в сторону роста уровня гетерозигот.

Таким образом, проведенное исследование выявило повышенную распространенность у татар-бухарцев медленного варианта фермента ДНК-лигазы 4 по сравнению с ялutorовскими татарами. Кроме того, у татар-бухарцев отмечена сниженная частота гена ALDH2*А, что может обуславливать специфическую реакцию тоболо-иртышских сибирских татар тюменско-туринской подгруппы на этанол. Продемонстрированные особенности популяционно-генетической структуры обследованных групп татар находят отражение в адаптационном потенциале популяций и обуславливают специфику заболеваемости татар-бухарцев, в структуре которой, на лидирующих позициях находятся заболевания органов дыхания (47,3%) и в 2 раза чаще по сравнению с татарами ялutorовской подгруппы регистрируются заболевания онкологического профиля.

Научный руководитель – д.б.н., профессор Лавряшина М.Б. ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет».

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-06-00272-а и Государственного задания Минобрнауки РФ 2014/64.

Частота полиморфизма rs16835198 гена иризина FNDC5 в популяции якутов (Восточная Сибирь)

Дьяконов Егор Егорович¹, Тимофеева Ньургуйаана Дмитриевна¹, Пшеничникова Вера Геннадиевна², Находкин Сергей Сергеевич¹

¹Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск

²Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Россия, Якутск

diakonov2007@mail.ru

Показано, что недавно открытый гормон иризин (кодируется геном FNDC5), способен вызывать дифференцировку адипоцитов белого в адипоциты бурого жира, и тем самым повышать уровень термогенеза и основного обмена в организме как мышей, так и человека, что особенно важно в условиях холодного климата. Поскольку среднегодовая температура в Якутии составляет -9,3°C, а минимальная может доходить до -72°C, представляется интересным возможность исследования полиморфизма гена FNDC5 в популяции якутов, проживающих в условиях субарктического климата Восточной Сибири.

Целью работы является анализ частоты полиморфизма rs16835198 в гене *FNDC5* в популяции якутов.

Выборку составили 175 индивидов, якутов по этнической принадлежности (мужчин-47, женщин-128), средний возраст которых составил $-21 \pm 1,96$ год, а средний индекс массы тела - $21,395 \pm 1,68$. Детекция полиморфизма rs16835198 была проведена методом ПЦР-ПДРФ, который включал использование обратного миссмачч - праймера для создания искусственного сайта узнавания для рестриктазы *EcoRI* (СибЭнзим, г. Новосибирск).

Частота генотипов по полиморфизму rs16835198 в популяции якутов составила: GG - 0,44 (77/175), GT - 0,44 (77/175) и TT - 0,12 (21/175). В целом, частота аллеля G составила 0,66 (231/350), а аллеля T - 0,34 (119/350). Наблюдаемая гетерозиготность локуса составила 0,4400, в то время как ожидаемая гетерозиготность - 0,4488, что соответствует распределению по Харди-Вайнбергу. При сравнении полученных данных с данными проекта 1000 Genomes (<http://1000genomes.org>; Phase 3, февраль 2016) распределение частоты аллелей rs16835198 в популяции якутов были сопоставимы со средними частотами аллелей в европейских (EUR), восточноазиатских (EAS), южноазиатских (SAS) и американских (AMR) популяциях: G – 0,64; 0,54; 0,62; 0,56, T – 0,36; 0,46; 0,38; 0,44 соответственно. Африканские популяции (AFR) резко отличались, за счет низкой частоты аллеля T (G – 0,97, T – 0,03).

Результаты анализа частоты rs16835198 гена *FNDC5* в популяции якутов показали возможность использования данного полиморфизма в качестве маркерного для ассоциативных исследований, связанных с изучением адаптаций к экстремально низким температурам и холодному климату.

Выражаем искреннюю признательность научному руководителю к.б.н. Барашкову Н.А. (ЯНЦ КМП, г. Якутск). *Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ №ГК6.656.2015/К.*

Частота встречаемости полиморфизмов генов фолатного цикла у студентов русской и казахской национальностей

***Жукова Юлия Дмитриевна, Петрякова Юлия Александровна,
Уркумбаева Сауле Курмангалиевна***

*Астраханский государственный университет, Россия, Астрахань
iuliya.zhukova@yandex.ru*

Исследования показали, что восприимчивость организма к вредным воздействиям в значительной мере зависит от активности ферментных систем. В частности, полиморфные аллели генов фолатного цикла, особенно при их ассоциации, обладают выраженным влиянием на активность ряда ферментов, что приводит к увеличению уровня гомоцистеина в крови, риску невынашивания и врожденным дефектам плода. Частота полиморфных локусов может значительно варьировать в популяциях, разделенных по этническому признаку.

В связи с этим, целью представленной работы стало изучение частоты встречаемости нуклеотидных замен в генах фолатного цикла у студентов двух этнических групп (русские и казахи) методом ПЦР.

В гене *MTR_2756* гомозиготная замена GG в 9 раз чаще встречалась у казахов – 57,1%, в то время как у русских составила только 6,3%. Гомозиготы по норме и

гетерозиготы в выборке последних встречались с одинаковой частотой. Снижение активности В12-зависимой метионин-синтазы, обусловленное полиморфизмом вышеуказанного гена, приводит к снижению уровня гомоцистеина в ответ на увеличение содержания фолатов в пищевых продуктах.

Аналогичная динамика прослеживалась и для гена *MTHFR_677*: замена по двум аллелям ТТ у казахов достигла 19%, у русских – 2,1%. Однако в гетерозиготном состоянии этот полиморфный ген несколько чаще встречался у представителей русской национальности (41,6 к 23,8 %). Функциональная активность соответствующего гена – метилентетрагидрофолатредуктазы – в случае замены обоих аллелей снижается до 35%, одного аллеля – до 65% от нормы.

Ген *MTHFR_1298*, в отличие от предыдущих, у русских студентов содержал замены значительно чаще: АС – 41,6%, СС – 12,5%, что в 1,5 и 3 раза больше, чем у казахов. Одинаковая частота всех трех состояний выявлена для гена *MTRR_66* с преобладанием гетерозигот АG над нормой АА и гомозиготами GG.

Согласно полученным результатам, из выборочной совокупности студентов более подвержены возникновению гомозиготных нуклеотидных замен и соответствующим метаболическим эффектам студенты казахской национальности.

Молекулярно-генетическое тестирование представителей национальной команды беларуси по пожарно-спасательному спорту

Жур К. В.¹, Кундас Л. А.¹, Головкова И.В.², Питомец С. П.², Моссэ И. Б.¹

¹ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Беларусь, Минск

*² Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр спорта", Беларусь, Минск
zhur_kv@mail.ru*

Цель работы – провести молекулярно-генетическое тестирование высококвалифицированных спортсменов пожарно-спасательного спорта для выявления аллельных вариантов, ассоциированных с высокими спортивными достижениями.

Протестированы 29 спортсменов сборной команды Республики Беларусь по пожарно-спасательному спорту и 160 человек контрольной группы. Генотипирование по 14-ти полиморфизмам 12-ти генов проводили методом ПЦР. Относительный уровень экспрессии генов *HIF1A*, *MTHFR* и *UCP2* определяли методом ПЦР с обратной транскрипцией. Метаболические показатели физической работоспособности оценивали с помощью системы многофакторной экспресс-диагностики (Д-Тест).

Генотипирование показало, что в группе спортсменов частоты аллельного варианта Val55Val гена *UCP2*, способствующего проявлению выносливости, а также варианта A1298A гена *MTHFR*, благоприятного для сердечно-сосудистой системы атлета, в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе. Выявлена достоверная ассоциация исследованных полиморфизмов генов A79G MB, Val55Ala UCP, G/T EPO и C1298A *MTHFR* с показателями аэробной физической работоспособности атлетов, а полиморфизма гена R577X *ACTN3* - с анаэробной.

В то же время в группе спортсменов значительно чаще, чем в контрольной выборке, встречались опасные мутации Лейдена и гена протромбина, неблагоприятные аллельные варианты 4a/4a и T894T гена *eNOS*, а также T677T гена *MTHFR*. Результаты

генотипирования были переданы врачам команды для корректировки эффектов неблагоприятных вариантов генов.

Анализ экспрессии выявил значительную индивидуальную вариабельность в активности исследованных генов на различных этапах подготовки спортсменов. При этом экспрессия генов UCP2 и MTHFR в условиях более высокой физической нагрузки была достоверно выше, чем на этапе общефизической подготовки. Установлена также достоверная корреляция экспрессии генов MTHFR и UCP2 с емкостью анаэробного лактатного энергообеспечения ($r=0,79$ и $r=0,83$ соответственно) и экспрессии гена UCP2 - с максимальным потреблением кислорода ($r=0,71$), общей метаболической мощностью ($r=0,76$) и концентрацией лактата в крови ($r=0,92$).

Таким образом, комплексный подход, включающий в себя как генотипирование атлетов, так и анализ экспрессии генов, ответственных за адаптацию к интенсивным физическим нагрузкам, обеспечивает более эффективный отбор перспективных спортсменов, а также позволяет корректировать программу тренировок для каждого спортсмена индивидуально с целью сохранения его здоровья и повышения результативности.

Полиморфизм генов, ассоциированных с серотонин- и дофаминергической системой, у спортсменов-единоборцев

Козлова Анна Сергеевна

*Республиканский научно-практический центр спорта, Беларусь, Минск
annette.kozlova@gmail.com*

Физический потенциал человека зависит от многих генетических и средовых факторов. Определение генетических особенностей индивидуумов позволяет выделить лиц, обладающих наибольшим потенциалом к деятельности, связанной со специальными навыками.

Большинство исследований в спортивной генетике направлено на выявление маркеров, ассоциированных с мышечной, сердечно-сосудистой и дыхательной системой. Важным фактором эффективности подготовки спортсменов являются особенности высшей нервной деятельности: стрессоустойчивость, темперамент, когнитивные способности. Цель настоящего исследования — оценка распространенности полиморфных аллелей генов, ассоциированных с работой серотонин- и дофаминергической системы.

Ген *5HT2A* кодирует один из наиболее чувствительных рецепторов серотонина. Наиболее значим для исследования полиморфизм C102T: T-аллель ассоциируют с повышенной экспрессией гена и, соответственно, с повышенной агрессией, импульсивностью, высокой скоростью развития усталости.

Ген *5-HTTLPR (5HTT)* – вырожденный участок в гене *SLC6A4*, который кодирует белок-переносчик серотонина. Физиологически значимый полиморфизм в промоторе гена характеризуется инсерцией или делецией 44 пар оснований. При коротком аллеле транспортер меньше транскрибируется и слабо представлен на пресинаптической мембране.

Ген *COMT* кодирует катехол-о-метилтрансферазу. Наиболее значимый для исследования полиморфизм Val158Met вызывает 3-4 кратное снижение активности *COMT*.

Объект исследования — буккальный эпителий 70 высококвалифицированных спортсменов-единоборцев. Группа сравнения — 120 клинически здоровых добровольцев, не занимающиеся спортом. Молекулярно-генетическую диагностику проводили методами классической полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Были выявлены статистически значимые различия в двух группах. У единоборцев была выявлена повышенная частота генотипа *5HT2A* TT (84.29% против 31.67% в группе сравнения, $p < 0.001$). Также у спортсменов отсутствовали лица с генотипом *5HT2A* CC (0.00% против 7.50%, $p < 0.01$).

Анализ по генам *5HTT* и *COMT* не выявил статистически значимых различий ($p > 0.05$). В обеих группах преобладали генотипы *5HTT* SS и *COMT* AG.

Таким образом, можно предположить, что аллель *5HT2A* является значимым молекулярно-генетическим маркером предрасположенности к занятиям единоборствами, а выявленные особенности генотипа могут способствовать успешности обследованных спортсменов в выбранных видах спорта.

Генетическая дифференциация популяций немецкой и восточно-европейской овчарок по микросателлитным локусам

Коптев В.В.¹, Калашников А.Е.²

¹*ФГБОУ ВПО Ярославская Государственная сельскохозяйственная академия,
Россия, Ярославль*

²*ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства имени Академика Л.К. Эрнста,
Россия, Дубровицы
idnatechnology@yandex.ru*

Потеря породного разнообразия у собак оказывается не только утратой уникального и бесценного генетического разнообразия, но и приводит к резкому сокращению количества разводимых пород, а также уменьшению поголовья служебных собак. В настоящее время в России приняты стандарты пород немецкой овчарки (НО) и восточно-европейской овчарки (ВЕО) и обе породы активно разводятся кинологами клубами. ВЕО была выведена из немецкой овчарки в 30-е гг. 20 в. в СССР для службы в армии в различных климатических условиях. ВЕО признана кинологами международными организациями: UCI (United Clubs International), IKU (International Kennel Union), и не признана Международной кинологической федерацией FCI вследствие недостаточного генетического подтверждения ее происхождения. В обеих породах есть особи, которые подходят под оба стандарта пород одновременно, что позволяет утверждать о том, что ВЕО и НО представляют единую породу. Проведено тестирование собак обеих пород (N=89) по полиморфизму микросателлитов (MC) (рекомендованных ISAG (www.isag.us/), 9 (MC) маркеров (StockMarks Dogs Genotyping Kit, Applied Biosystems, США) с учетом данных экстерьерных измерений собак. Материалом для исследования послужили животные различных половозрастных групп, которые также оценены по экстерьеру. Для решения вопроса происхождения ВЕО нами проведена паспортизация обеих пород и рассчитаны генетические расстояния между ними. В результате построены экстерьерные профили, взаимосвязанные с аллельными вариантами MC маркеров и произведена их статистическая оценка. По результатам исследований

выявлена взаимосвязь между показателями экстерьера и положениями аллельных вариантов.

Геномные исследования молекулярно-генетических основ поведения на примере экспериментальных линий американской норки *Neovison vison*

Крылова А.С.^{1,2}, Манахов А.Д.^{1,2}

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН,
лаборатория эволюционной геномики, Россия, Москва

krylova.gen@gmail.com

В процессе одомашнивания животные приобретают новые признаки, не свойственные их диким предкам, среди которых важную роль играют отсутствие страха и дружелюбное отношение к человеку. Вновь приобретенные черты сохраняются у одомашненных животных в течение многих поколений, что свидетельствует о наличии генетических механизмов, обуславливающих неагрессивное поведение этих животных по отношению к человеку.

Эксперименты проводились на линиях американских норок (*Neovison vison*), выведенных на базе Института Цитологии и генетики СО РАН. Нами впервые было проведено полногеномное секвенирование ДНК американских норок из экспериментальных линий, характеризующихся по типам поведения по отношению к человеку (ручные и агрессивные), а также животных, которые не подвергались отбору по поведению. Исследуемые животные кроме того имели специфическую окраску меха, предположительно возникающую в результате искусственного отбора на различные типы поведения. Были исследованы животные со стандартной окраской, серебристо-голубой и белый хедлунд. Полногеномное секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq 2500 в ИОГене РАН.

В результате анализа данных глубокого секвенирования двух ручных, одной агрессивной и двух неселектированных норок нами были реконструированы полные нуклеотидные последовательности некоторых генов, предположительно вовлеченных в формирование агрессивного поведения (включая гены *MAOA* и *MAOB*), а также гены, связанные с различными типами окраски у животных (в том числе *MC1R*, *ASIP*). Анализ кодирующих областей генов *MAOA* и *MAOB* у норок с разными типами поведения не выявил наличия несинонимичных замен, приводящих к изменениям в аминокислотной последовательности. Таким образом маловероятно, что агрессивное и/или ручное поведение в исследованных линиях американских норок связано с мутациями в кодирующих областях генов моноаминоксидаз, что позволяет предположить существование других, пока не известных молекулярно-генетических механизмов, приводящих к различиям в поведении изучаемых линий животных. При анализе генов, вовлеченных в формирование окраски у млекопитающих, у американских норок, имеющих окраску белый хедлунд, были выявлены мутации в кодирующих участках генов, ведущие к изменению аминокислотной последовательности соответствующих белков. Выявленные мутации в дальнейшем будут протестированы на большей выборке животных и потенциально могут служить маркерами данной окраски.

Полученные данные будут использованы для идентификации молекулярно-генетических факторов различных типов поведения, а также могут быть полезны в пушном звероводстве при выведении линий животных с новыми окрасками меха.

Данная работа поддержана программой РНФ № 14-50-00029 и Правительством РФ 14.B25.31.0033. Авторы выражают благодарность научным руководителям Е.И. Рогаеву и Т.В. Андреевой и сотрудникам лаборатории эволюционной геномики ИОГен РАН, а так же О.В. Трапезову, за предоставленные образцы американских норок и обсуждение. Работа по геномному исследованию линий американской норки *Neovison vison*, в которой принимали участие студенты МГУ им Ломоносова (К.А.С. и М.А.Д.), проводится в рамках сотрудничества лаборатории ИОГена и Института Цитологии и генетики СО РАН (Рогаев Е.И., О.В. Трапезов).

Поиск мутаций в линиях *Drosophila melanogaster* с фенотипом flamenco с использованием данных, полученных при секвенировании транскриптома

Кукушкина Инна Валерьевна, Кузьмин Илья Владимирович

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

vladimirova-bph@yandex.ru

Контроль перемещений мобильных генетических элементов (МГЭ) важен для поддержания стабильности генома любого организма. У *Drosophila melanogaster* существуют линии, характеризующиеся повышенной активностью некоторых групп МГЭ, в частности ретротранспозонов группы *gypsy*. Чаще всего повышенная экспрессия ретроэлементов вызвана нарушением работы генов, задействованных в системе РНК-интерференции. Известно, что перемещения МГЭ группы *gypsy* контролируются локусом *flamenco*, выступающим в качестве источника малых РНК (рiРНК), необходимых для процесса РНК-интерференции.

В нашей лаборатории имеются линии (SS и MS) с нарушением контроля элементов группы *gypsy*. Их обозначают как линии с фенотипом *flamenco*. До сих пор сложно точно определить первопричину данного проявления признака. Возможно, в линиях присутствуют мутации ранее не описанные в литературе, которые могут прямо или опосредованно нарушать регуляцию экспрессии МГЭ группы *gypsy*.

Для исследования причин нарушения контроля МГЭ в линиях с фенотипом *flamenco* провели секвенирование транскриптома, так как этот метод позволяет одновременно получить информацию об экспрессии генов, а также о наличии мутаций в экзонах активно транскрибирующихся генов. Были исследованы образцы РНК взрослых мух линий SS (*w*, мутант *flamenco*), SS_w1 (*w*, мутант *flamenco*, отводка линии SS), MS (*w*, мутант *flamenco*, активная копия *gypsy*). Линия D32 (лабораторная линия дикого типа) была использована в качестве контроля. Секвенирование проводилось с помощью прибора Illumina HiSeq 2000. Длина прочтений составляла 50 п.н. Прочтения картировались на референсный геном BDGP6 с использованием программы Tophat2 (v2.0.13). Одной из первоочередных задач являлся поиск нонсенс-мутаций, для чего нами была разработана программа, позволяющая находить замены нуклеотидов, приводящие к формированию стоп кодонов. В отличие от ряда доступных нам сторонних программ, реализованный нами алгоритм поиска позволяет выявить замены аминокислот происходящие вследствие одновременного изменения двух нуклеотидов в триплете, так как происходит анализ триплетного кода. Данная программа является модульной, что

позволяет настроить ее под любую поставленную задачу в рамках исследования. На данный момент программа содержит модули: чтения, анализа, исключения повторов, фильтра и нахождения пересечения двух прочтений геномов. Использование конфигурационных файлов позволяет автоматизировать решение поставленной задачи. Фильтрация результатов может быть осуществлена по представленности замены среди всех последовательностей прочтений, по количеству прочтений с заменами и общему количеству прочтений. Так же возможен поиск мутаций приводящих к замене с одной группы аминокислот на другую (включая стоп-кодоны).

В результате анализа обнаружено около 7 000 нуклеотидных замен относительно референсного генома, из которых до 1% мутаций соответствовали появлению стоп-кодонов в открытых рамках считывания. Например такие замены произошли в кодирующей части генов *cup9b1*, *crb*, *CG2121*, *CG15345*, *list*, *CG13101*. В данный момент мы занимаемся анализом нонсенс-мутаций, найденных программой.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00729 мол_a и 14-04-01450 А.

Наследование признаков расположение ветвей, высоты растения и времени выхода из стадии розетки у сафлора красильного *Carthamus tinctorius* Linnaeus, 1753

Леус Татьяна Викторовна

Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины, Украина, Запорожская обл., пос. Солнечный

tatiana_leus@list.ru

Изучены признаки расположение ветвей, высота растения и время выхода из стадии розетки у сафлора красильного. Выделяют эректоидное, нормальное и раскидистое расположение ветвей, среднюю и большую высоту растения и обычное и позднее время выхода из стадии розетки. Целью нашей работы было выяснение характера наследования описанных признаков у сафлора.

Исследование проводилось в 2009-2015 годах на базе Института масличных культур НААН. В скрещиваниях участвовало 4 образца коллекции.

При скрещивании растений с эректоидным и нормальным и эректоидным и раскидистым расположением ветвей гибриды первого поколения имели нормальное расположение ветвей. Во втором поколении наблюдалось расщепление по схеме 3:1 на растения с нормальным и эректоидным либо с нормальным и раскидистым расположением ветвей. При скрещивании высокорослых растений с поздним временем выхода из стадии розетки с растениями среднего роста и обычным временем выхода из стадии розетки в первом поколении гибриды имели средний рост и обычное время выхода из стадии розетки. Во втором поколении наблюдалось отклонение от менделевского расщепления, схема 9:3:3:1, предполагающая независимое комбинирование генов, не соблюдалась. Нами были получены следующие цифры. В первом опыте в расщеплении наблюдалось 30 растений среднего роста с обычным временем выхода из стадии розетки, 1 высокорослое растение с обычным временем выхода из стадии розетки, 1 растение среднего роста с поздним временем выхода из стадии розетки и 10 высокорослых растений с поздним временем выхода из стадии розетки. Во втором опыте эти числа составляли 56:3:2:17, а в третьем — 125:1:3:23 соответственно.

Мы сделали следующие выводы о характере наследования описанных признаков у сафлора. Нормальное расположение ветвей доминирует как над раскидистым, так и над

эректоидными типами. Средний рост растения доминирует над высоким, а обычное время выхода из стадии розетки — над поздним. Признаки высоты растения и времени выхода из стадии розетки наследуются сцепленно. Это сцепление не полное, подсчёт расстояния между генами, кодирующими данные признаки, показал, что оно составляет 6,13 морганиды.

**Реконструкция полного митохондриального генома *Turritopsis dohrnii*,
животного с обратной онтогенезом**

Лисенкова А.А., Манахов А.Д.

*Институт Общей Генетики имени Н.И. Вавилова РАН,
лаборатория эволюционной геномики, Россия, Москва
biolisenkova@yandex.ru*

Turritopsis dohrnii (Weismann, 1883) (Cnidaria, Hydrozoa, Hydrozoa, Anthothecata) - животное, способное обращать вспять свой жизненный цикл и переходить из стадии с половым размножением (медуза) обратно в стадию, размножающуюся бесполом путем (полип). Изучение генома этого вида с целью выявления генетических особенностей, делающих возможным подобный метаморфоз, было начато нами с реконструкции и анализа полного митохондриального генома *T. dohrnii*.

Было проведено глубокое секвенирование образцов тотальной ДНК *T. dohrnii* с использованием прибора HiSeq 2000. На основе полученных данных глубокого секвенирования была проведена сборка митохондриального генома, после чего при помощи дополнительных ПЦР и последующего прямого секвенирования ПЦР-продуктов методом Сэнгера, удалось реконструировать полную последовательность митохондриальной ДНК *T. dohrnii*.

Проведенный анализ показал, что митохондриальный геном *T. dohrnii* представлен одной линейной хромосомой, включающей в себя 13 белок-кодирующих генов, 2 гена тРНК и два гена рРНК. Один из белок-кодирующих генов имеет частичную инвертированную копию в другой части генома, что характерно для некоторых представителей подкласса Hydrozoa, к которому принадлежит *T. dohrnii*. Также были выявлены отличия третичной структуры некоторых белков *T. dohrnii* по сравнению с белками ближайшими родственниками данного вида (*Clava multicornis*, *Rathkea octopunctata*, *Nemopsis bachei*).

Был проведен филогенетический анализ представителей класса Hydrozoa на основе последовательностей 13 белок-кодирующих генов, а также малой субъединицы (12S) рРНК и ее вторичной структуры, при помощи методов максимального правдоподобия и Байеса. В ходе анализа были выявлены новая топология для подотряда Filifera IV, отличная от представленной ранее на основе выборки, не содержащей *T. dohrnii* в своем видовом составе, а также установленной при помощи более коротких филогенетических маркеров.

В результате работы нами была получена полная последовательность линейного митохондриального генома *Turritopsis dohrnii*. В данный момент нами продолжается реконструкция полного генома этого организма с целью выявления генетических особенностей, позволяющих *T. dohrnii* проходить обратный метаморфоз из половозрелой медузы в полип, стадию бесполого размножения.

Автор выражает благодарности научным руководителям Е.И. Рогаеву и Т.В. Андреевой, а также соавторам работы и будущей публикации по полученным результатам: Григоренко А.П., Гусеву Ф.Е., Гольцову А.Ю., Тяжеловой Т.В. и зарубежным коллегам Piraino S. и Miglietta M.P.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 14-50-00029.

Особенности воспроизводства межвидовых гибридов в комплексе зеленых лягушек *Pelophylax esculentus* в популяционных системах европейской части России

Литвинчук Юлия Спартаковна¹,

Свинин Антон Олегович², Дедух Дмитрий Викторович¹

¹*Санкт-Петербургский государственный университет,*

Россия, Санкт-Петербург

²*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань*

Гибридные животные, возникающие в результате межвидовой гибридизации, зачастую нежизнеспособны или стерильны. Однако изменения гаметогенеза, такие как элиминация и эндорепликация геномов, позволяют им воспроизводиться вместе с родительскими видами. Удобной моделью для изучения межвидовой гибридизации и воспроизводства гибридов в естественных популяционных системах является комплекс средневропейских зеленых лягушек, представленный двумя родительскими видами - прудовой лягушкой (*P. lessonae*), озерной лягушкой (*P. ridibundus*), а также их естественным гибридом съедобной лягушкой (*P. esculentus*). Целью нашей работы является исследование механизмов воспроизводства в этом гибридогенетическом комплексе. Для изучения особенностей гаметогенеза гибридов, их роли в поддержании общих для гибридов и родительских видов популяционных систем из европейской части России (республика Марий Эл), мы провели лабораторные скрещивания родительских видов друг с другом и гибридными лягушками.

Мы получили головастики от 4 скрещиваний *P. lessonae* и *P. ridibundus* и от 18 скрещиваний самок *P. lessonae* и диплоидных гибридных самцов. В результате кариотипирования и детекции интерстициальных сайтов теломерного повтора методом FISH мы показали, что головастики во всех скрещиваниях представлены только диплоидными гибридами. Таким образом, гибридные самцы образуют только гаметы, несущие геном *P. lessonae*. У большинства гибридных головастиков зародышевые клетки аномально распределяются в гонадах, присутствуют в меньшем количестве или даже полностью отсутствуют. Однако в гонадах некоторых гибридных головастиков в цитоплазме зародышевых клеток мы обнаружили микроядра, наличие которых может свидетельствовать об элиминации генома. Мы также охарактеризовали наборы хромосом, передаваемых в ооцитах диплоидных гибридных самок. Среди проанализированных самок, одна самка производила ооциты с 13 бивалентами, в то время как три другие самки производили ооциты с 26 унивалентами, соответствующими хромосомам обоих родительских видов.

Мы можем заключить, что в результате скрещивания родительских видов друг с другом и скрещивания самок *P. lessonae* и гибридных самцов возникают жизнеспособные гибридные особи. Однако малое количество зародышевых клеток в гонадах головастиков и наличие у взрослых гибридных самок ооцитов с 26 унивалентами свидетельствуют о нарушениях элиминации и эндорепликации геномов в гаметогенезе у гибридных особей.

Выражаю благодарность научному руководителю А. В. Красиковой.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров «Научного парка» СПбГУ (ЦКП «Хромас», «Развитие молекулярных и клеточных технологий»).

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-34-21020.

Роль полиморфизма гена *MIR22* в развитии псориаза на фоне психических расстройств

Лунькова Анна Александровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

anna-lunkova@mail.ru

Псориаз – хроническое многофакторное заболевание, характеризующееся поражением кожи различной степени тяжести и имеющее под собой генетическую основу. Клинические и литературные данные иллюстрируют связь между псориазом и нарушениями психики. Данное заболевание существенно снижает качество жизни человека и требует пристального изучения генетических механизмов его возникновения. Ранее в нашей научной группе была показана ассоциация однонуклеотидной замены rs6502892 (C>T) в гене *MIR22* человека с паническими расстройствами. Ген расположен на коротком плече 17 хромосомы и кодирует микроРНК, регулирующие генную экспрессию некоторых белок-кодирующих генов на пост-транскрипционном уровне.

В исследовании участвовало две группы: пациенты с диагнозом псориаз (69 человек) и условно-здоровые индивиды (контрольная группа, 163 человека). ДНК выделяли из цельной крови. Анализ аллельного состояния замены rs6502892 проводили с использованием ПЦР-ПДРФ, эндонуклеаза рестрикции *FauI*. Для анализа ассоциации использовали критерий Пирсона (хи-квадрат).

Распределение частот генотипов для контрольной группы соответствует равновесию Харди-Вайнберга, а для пациентов с псориазом не соответствует ($p=0,00003$, $\chi^2=17,64$). В результате статистического анализа для исследуемой замены была обнаружена ассоциация с псориазом ($p<0,004$, $\chi^2=11,09$). Также статистический анализ показал рецессивную модель наследования для ассоциированного аллеля Т ($p=0,02$, $\chi^2=5,25$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможном участии продукта гена *MIR22* в развитии псориаза.

Исследование влияния ретровируса *gypsy* на экспрессию гена *Gagr*, геномного гомолога гена *gag* ретровирусов, у *Drosophila melanogaster*.

Махновский Павел Александрович, Балакирева Евгения Игоревна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

maxpavel@gmail.com

Ген *Gagr* (*Gag related protein*) представлен в геномах всех секвенированных видов рода *Drosophila* и является результатом давней молекулярной доместикиции. Последовательность *Gagr* имеет значительное сходство с *gag* ДКП-ретротранспозона *Transpac* из группы *gypsy*. Функция и особенности регуляции *Gagr* мало изучены.

В данной работе исследованы особенности тканеспецифической и онтогенетической экспрессии гена *Gagr* у *D.melanogaster* и влияние ретровируса *gypsy* на эту экспрессию. Для оценки экспрессии использовались методы qPCR и вестерн-блот гибридизация. Использовались линии с нарушенным контролем транспозиции

ретротранспозонов (SS и MS, с фенотипом *flamenco*), одна из которых (MS) имеет активные копии *gypsy* в геноме, также использовали контрольную линию дикого типа Д-32. Нами установлены стадии развития и паттерны экспрессии, в которых происходит противовирусный ответ с активацией Jak-STAT-сигнального пути.

Показано, что ретровирус *gypsy* имеет наибольшее влияние на экспрессию гена *Gagr* у ранних куколок, вместе с тем на этой стадии констатируем вирусную активацию Jak-STAT-сигнального пути, выраженную в увеличении экспрессии *vir-1* во много раз. Показаны значительные различия в экспрессии гена *Gagr* как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне у ранних куколок.

Среди органов, в которых обнаружен противовирусный ответ и активация экспрессии *Gagr* следует особо отметить каркас брюшка. Примечательно, что у самцов в сравнении с самками экспрессия *Gagr* в этом органе выше и, вероятно, этим определяются различия в тотальной экспрессии *Gagr* у особей разных полов у линии SS, этих различий нет у линии MS. Также, вероятно, *gypsy* активирует гены *vir-1* и *Gagr* у самок в каркасе головы и задней кишке. У самцов наличие активной копии *gypsy* на фоне фенотипа *flamenco* не влияет ни на активацию Jak-STAT-сигнального пути, ни на экспрессию гена *Gagr* в исследованных органах.

Анализ экспрессии гена *Gagr* у гибридов от скрещивания линии MS и линии дикого типа D-32 подтвердил влияние *gypsy* и локуса *flamenco* на экспрессию гена *Gagr*.

Таким образом, для гена *Gagr* показан специфичный для разных стадий развития и органов ответ на ретровирусы. Обнаружено, что для такого ответа, как правило, характерна вирус-индуцируемая активация сигнального пути Jak-STAT, что указывает на возможную регуляцию гена *Gagr* этим сигнальным путём.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00729 мол_а и 14-04-01450 А.

Изучение геномного полиморфизма гетероцистных цианобактерий на примере природных изолятов *Anabaena* sp.

Мещерякова Полина Васильевна, Женавчук Оксана Федоровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

polina30091994@mail.ru

Нитчатые гетероцистные цианобактерии родов *Anabaena/Nostoc* имеют уникальное экологическое значение, распространены повсеместно, способны к фотодиазотрофному росту, морфологической дифференцировке клеток, образованию симбиоза с грибами и растениями. Высокая азотфиксирующая активность изолятов *Anabaena/Nostoc* обуславливает перспективность их биотехнологического использования как источников азота и молекулярного водорода. Сейчас секвенированы лишь несколько геномов штаммов *Anabaena/Nostoc*, чего недостаточно для всестороннего анализа этой высокоорганизованной, распространенной группы цианобактерий, установления филогенетических связей между отдельными изолятами, изучения генетических и экофизиологических аспектов их распространения и адаптации.

Изоляты *Anabaena*, выделенные из полостей листьев папоротника *Azolla* или с листьев растений риса, по ряду молекулярно-генетических характеристик практически неотличимы от модельного штамма *A. variabilis* ATCC29413. Целью данного исследования является углубленное генетическое изучение ассоциативных и симбиотических штаммов *Anabaena* из коллекции кафедры генетики Биологического факультета МГУ.

Нами проведена морфологическая, физиолого-биохимическая характеристика и молекулярно-генетический анализ методом ПЦР-фингерпринтинга геномов двух ранее не изучавшихся штаммов, выделенных из ассоциаций с растениями риса и папоротником *Azolla*. ПЦР-фингерпринтинг с праймерами на основе повторяющихся последовательностей и IS-элементов не обнаруживает существенных различий. Для сравнения геномов *Anabaena* 182, *Anabaena* V5 и референсного штамма *A. variabilis* был использован метод полногеномного пиросеквенирования. Выявленные отличия при полной синтении геномов затрагивали не более 1,2% генома штаммов. Поскольку метод пиросеквенирования дает неопределенные результаты в областях геномов, содержащих протяженные совершенные повторы, полученные данные были проверены с помощью ПЦР. Установлено, что геномы исследуемых штаммов очень близки, за исключением ряда однонуклеотидных замен в белок-кодирующих областях геномов обоих штаммов, наличие протяженной инсерции в один из генов гистидин-киназы у штамма 182 и отсутствия линейного инцизионного элемента у штамма V5. Нами сформулировано предположение, что эпифитный штамм *Anabaena* 182 и минорный симбионт *Anabaena* V5 аналогичны свободноживущей *A. variabilis* и могут рассматриваться как независимые изоляты одного вида. Мы предполагаем, что группа штаммов-изолятов минорных симбионтов *Anabaena* не является искусственным образованием, а имеет общее происхождение в рамках сложноорганизованного генома, обеспечивающего миксотрофный тип метаболизма и успешное взаимодействие с растениями.

Поиск новых генов-кандидатов, мутации в которых приводят к фенотипу flamenco у *Drosophila melanogaster*

Миляева Полина Андреевна, Лавренов Антон Русланович

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
atemeda@mail.ru*

Мобильные генетические элементы (МГЭ) широко распространены среди разных групп организмов, начиная с бактерий и заканчивая высшими растениями и млекопитающими. В геноме эукариот повторяющиеся последовательности занимают 30-80% генома. Большая часть этих повторов представлена МГЭ. На сегодняшний день широко известно, что их роль в развитии и жизни организмов неоднозначна: они могут быть как источником новых мутаций так и материалом для новых генов у хозяина в процессе эволюции.

Данная работа была выполнена на модельном объекте генетики - *Drosophila melanogaster*. У дрозофилы в перичентромерном районе X-хромосомы есть локус *flamenco*, который служит источником антисмысловых РНК (piРНК) для контроля транспозиции МГЭ. Сам механизм синтеза piРНК и замалчивания мРНК МГЭ - это сложный многостадийный процесс, который контролируется большим количеством генов. Piwi-зависимый путь РНК-интерференции и контроля транспозиции ещё не полностью изучен.

Для выявления новых генов было проведено секвенирование транскриптома линий D32 (дикий тип) и SS(7K) (мутант) и анализ полученных данных. Одной из задач было выявление генов с нонсенс-мутациями. Основываясь на данных секвенирования мы подобрали праймеры для аллель-специфичной ПЦР к предполагаемым заменам, приводящим к появлению стоп-кодонов внутри открытых рамок считывания. Было

проведено несколько серий количественных ПЦР как с ДНК пула мух (по 7 особей в каждом пуле), так и с ДНК и РНК, выделенных из отдельных особей. Наличие той или иной формы аллеля выявляли по различию в количестве циклов ПЦР продуктов с использованием разных пар праймеров по каждому из образцов. Проанализировав полученные данные, мы провели серию таких же опытов для линии MS(145), которая возникла от линии SS(7K) путём введения активной копии ретротранспозона *gypsy*.

В результате, из девяти нонсенс-мутаций, предсказанных в результате биоинформатического анализа данных секвенирования подтверждено наличие по крайней мере в четырёх: *gste5* (CG17527), CG31918, CG33346, *cup9b1* (CG4485). Наличие этих мутаций было исследовано также у линии MS (145), для которой секвенирование транскриптома не проводилось. Некоторые из этих генов могут быть рассмотрены в качестве потенциальных участников Рiwi-зависимого пути РНК-интерференции.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00729 мол_a и 14-04-01450 А.

Филогенетические взаимоотношения снежного барана и некоторых аборигенных пород овец

Монгуш Омак Орланович

Российский государственный аграрный университет – МСХА

имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва

tongush.omacki@yandex.ru

Детальное изучение генофондов пород сельскохозяйственных животных является необходимым условием для эффективного контроля их генетической структуры, правильного подбора производителей и изучения влияния определенных геномных локусов на продуктивные качества с целью дальнейшего повышения продуктивности, что актуально и для племенной работы в овцеводстве. Известно, что источником важных адаптивных качеств, а также свойств устойчивости к определенным условиям среды и заболеваниям являются генофонды аборигенных пород, а также близкородственных видов (одним из таких примером является получение зебувидного скота устойчивого к вирусу бычьего лейкоза, имеющего глобальное распространение). В этой связи нами была проведена сравнительная характеристика генофондов локальных пород овец (карачаевской, калмыцкой, эдильбаевской) и близкородственного вида – снежного барана. На основании полученных ранее данных для выполнения этой работы были выбраны простые и эффективные методы полилокусного генотипирования – (ISSR-PCR, Inter Simple Sequence Repeats и IRAP-PCR, Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism), основанные на получении «анонимных» фрагментов ДНК с помощью праймеров, имеющих множественную локализацию в геноме. Для визуализации результатов применялся горизонтальный электрофорез в 1,5% агарозном геле с окраской бромистым этидием, математическая обработка выполнялась в программах TFGA и MS Excel. По методу Нея (1972) найдены значения генетических дистанций. Полученные данные наглядно иллюстрируют своеобразие генетической структуры исследуемых пород овец и близкого вида – снежного барана, для которого найдены «маркерные» локусы, отличающие генофонд этого вида от домашней овцы. Найдены характерные породоспецифичные локусы и особенности их распределения по спектрам амплификации у исследованных пород овец, определён уровень гетерозиготности (на основании расчетов индекса полиморфного информационного содержания локуса), на основании

распределения фрагментов ДНК по спектрам амплификации определены филогенетические взаимоотношения между изучаемыми группами животных.

Выражаю благодарность своему научному руководителю д.с.-х. наук, проф. Глазко Валерию Ивановичу за помощь в выполнении исследования.

Филогеография осетровых (Acipenseridae) в Обь-Иртышском бассейне

Побединцева Мария Алексеевна

Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

marob@mcb.nsc.ru

Стерлядь (*Acipenser ruthenus*) и сибирский осетр (*A. baerii*) относятся к семейству осетровых (Acipenseridae), имеющему древнее происхождение и занимающему особое положение на филогенетическом древе лучеперых рыб. Считается, что оба вида находятся на грани вымирания в связи с антропогенным воздействием, включающим строительство плотин и интенсивный вылов. Рыбоохранные мероприятия направлены на сохранение популяции и включают в себя разведение мальков в рыбных хозяйствах и их выпуск в естественную среду. Однако до сих пор не оценено влияние подобных мероприятий на состояние природных популяций.

Основная цель настоящей работы – описание генетической структуры популяций стерляди и сибирского осетра в Обь-Иртышском бассейне для формирования действенной стратегии охраны и рациональной эксплуатации данных видов.

Было проведено секвенирование контрольного района митохондриальной ДНК 245 особей стерляди и 113 особей сибирского осетра. Анализ полученных данных и их сравнение с опубликованными ранее данными позволили выявить в исследованных выборках стерляди и сибирского осетра 61 и 17 гаплотипов, соответственно (все гаплотипы стерляди были описаны впервые, тогда как у сибирского осетра впервые описано 9 гаплотипов). С помощью филогенетического анализа было выделено 11 основных гаплогрупп стерляди и всего две гаплогруппы сибирского осетра, представленных с разной частотой в разных районах бассейна.

Изучение гаплотипов обоих видов показало значительные межрегиональные отличия по генетическому разнообразию и гаплотипическому составу, что свидетельствует об их сложной популяционной структуре. Обнаружено, что генетическое разнообразие сибирского осетра значительно меньше. Необходимо дальнейшее сравнение изученных популяций стерляди и сибирского осетра Обь-Иртышского бассейна с популяциями Енисея, Волги, Дуная и Лены с целью изучения степени их изоляции и рационального планирования рыбоохранных мероприятий.

Исследование российской популяции голштинского крупного рогатого скота по генам *APAF1* и *SMC2*, ассоциированным с гаплотипами фертильности *HH1* и *HH3*

Романенкова Ольга Сергеевна

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени

академика Л.К. Эрнста, Россия, п. Дубровицы, Подольск

ksilosa@gmail.com

Увеличение в культурных породах крупного рогатого скота уровня гомозиготности, приводит к усилению влияния LoF-мутаций, которые считаются сегодня одной из основных причин снижения воспроизводительной способности коров.С

использованием данных о воспроизводительных качествах коров североамериканской популяции голштинской породы, генотипированных с помощью биочипа Illumina Bovine SNP50, на хромосоме 5 в области 58-66 Mb (сборка генома UMD 3.0) был картирован ген *APAF1*, ассоциированный с гаплотипом фертильности HH1, и на хромосоме 8 в области 90-95 Mb - ген *SMC2*, ассоциированный с гаплотипом фертильности HH3. Цель работы состояла в оценке распространения скрытых носителей гаплотипов HH1 и HH3 в популяции голштинского и голштинизированного крупного рогатого скота России с использованием разработанных тест-систем анализа полиморфизма генов *APAF1* и *SMC2*. ДНК из проб ткани уха или спермы выделяли методом экстракции перхлоратом или с помощью колонок Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Германия). Полиморфизм гена *APAF1* выявляли методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции *BstC8I*, гена *SMC2* - посредством АС-ПЦР с прямой детекцией ПЦР продукта в агарозном геле. Исследование 270 коров и 593 быков-производителей с использованием тест-системы *APAF1* выявило наличие 39 скрытых носителей HH1, в том числе 16 коров и 23 быков, что составило, соответственно, 5,9 и 3,9%. Выявленные скрытые носители HH1 принадлежали к линиям Вис Бэкайдиала 1013415, Рефлекшн Соверинга 198998, Монтвик Чифтейна 95679, Пабст Говернера, в соотношении 66,7, 28,0, 4,2 и 4,1%, соответственно. Исследование 353 коров и 632 быков-производителей с использованием тест-системы *SMC2* выявило наличие 49 скрытых носителей гаплотипа HH3, в том числе 35 коров и 14 быков, что соответствует частотам встречаемости, соответственно, 9,9 и 2,2%. Анализ линейной принадлежности выявил носителей HH3 среди быков-производителей линий Вис Бэкайдиала 1013415, Рефлекшн Соверинга 198998 и Пабст Говернера, при этом процентное распределение носителей по линиям установлено на уровне 54,5, 36,4 и 9,1%, соответственно. Показана эффективность проведения ДНК диагностики гаплотипов HH1 и HH3 с использованием разработанных тест-систем для скрининга и элиминации носителей данных генетических дефектов в популяции голштинского и голштинизированного скота России.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки России, уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60414X0062. В проведении исследований использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ВИЖ имени Л.К. Эрнста.

Картирование гена *TAENIATA* модельного объекта *Arabidopsis thaliana* и изучение его роли в регуляции развития листа

Силина Виктория Валерьевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

silina.viktoriya@inbox.ru

Рецессивная мутация *taeniata* у *A.thaliana* характеризуется образованием ассиметричных листьев, на которых могут возникать листоподобные выросты, почки. Целью работы являлось картирование гена *TAENIATA*, изучение его взаимодействия с другими генами. В работе использовали растительный материал из коллекции кафедры генетики. Применяли методы гибридологического анализа и анализа генных взаимодействий, метод выделения ДНК по Dellaporta, ПЦР, электрофорез в агарозном геле, метод гистохимического тестирования активности репортерного гена *GUS*. Проведен морфологический анализ мутанта на выборке из 25 растений. Количество листьев в

розетке у дикого типа и мутанта не отличается ($6,76 \pm 0,2$ Blanes, $6,84 \pm 0,15$ tae), однако большинство листьев розетки ($74 \pm 4,0\%$) у мутанта, в отличие от дикого типа, ассиметричные. Доля мутантов с листоподобными выростами составила 44%, а с почками на листьях - 20%. Создана популяция F2 от скрещивания мутанта с расами Blanes, Columbia. Получено расщепление 76 Blanes:26 tae: ($\chi^2_{3:1} = 0,013$, $P < 0,05$). Во втором случае наблюдали дигенное расщепление 198 Columbia: 15 tae: ($\chi^2_{1:15} = 0,227$, $P < 0,05$). Различия в расщеплениях на разном генетическом фоне можно объяснить наличием в расе Blanes в гомозиготе рецессивного аллеля второго гена, который взаимодействует с tae. Созданы CAPS-маркеры для картирования мутации. Выборка из 25 растений проверена по маркеру RLP26, локализованному во 2 хромосоме (в положении около 60 сМ). Установлено тесное сцепление маркера с исследуемым геном. Изучена экспрессия DR5::*GUS* для анализа локализации свободного ауксина, экспрессия гомеобоксного гена *KNAT1*, контролирующего недетерминированность клеток (в составе конструкции *KN1::*GUS**). Выявлены нарушения распределение ауксина у мутанта и эктопическая экспрессия *KNAT1*, которые могут объяснить образование листоподобных выростов и почек на листьях. Показано, что ген *TAE* взаимодействует с генами *ASI*, *AS2/SA*, контролирующими поляризацию листового примордия. Таким образом, ген *TAENIATA* играет важную роль в детерминации клеток листовой меристемы и в контроле полярности листа.

Исследование поддерживается грантом РФФИ №16-04-00437.

Оценка биоразнообразия дикой и домашней форм северного оленя рода *Rangifer tarandus* на основе анализа микросателлитов.

Соловьева Анастасия Дмитриевна

*Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста, (ВИЖ имени Л.К. Эрнста), Россия, Дубровицы
anastasiya93@mail.ru*

Северный олень является важнейшим элементом экосистемы и составляет неотъемлемую часть в жизни и культуре коренных народов Севера. Данный вид обитает в двух формах: дикой и domestифицированной (домашней) и изучение его генетического разнообразия всегда являлось актуальным. Наибольшее распространение для оценки биоразнообразия популяции получили панели микросателлитов – последовательностей ДНК, ограниченных инвертированными повторами (STR). В связи с этим, целью нашего исследования явилась молекулярно-генетическая характеристика биоразнообразия дикой и домашней форм северного оленя на основе анализа микросателлитов.

В качестве биологического материала для исследований использовались образцы тканей дикой (n=44) и домашней (n=91) популяций северного оленя, обитающих на территории Якутии, Полуострова Таймыр и Ненецкого Автономного округа. Полиморфизм 9 STR определяли по собственным методикам с использованием ДНК-анализатора ABI 3130xl. Программное обеспечение GenAlEx (ver. 6.5.1) было использовано для статистической обработки данных.

Дикая популяция северного оленя характеризовалась наибольшими значениями по числу эффективных и информативных аллелей $N_a = 11,0 \pm 1,14$, $N_e = 5,4 \pm 0,66$ против $N_a = 9,1 \pm 0,61$, $N_e = 4,8 \pm 0,48$ в сравнении с домашней популяцией. Уровень фактической (наблюдаемой) гетерозиготности составил $0,637 \pm 0,049$ у дикой популяции и $0,598 \pm 0,037$ -

у домашней популяции. Несущественные различия наблюдались в отношении уровня ожидаемой гетерозиготности: $0,787 \pm 0,031$ и $0,771 \pm 0,026$ у дикой и домашней популяций, соответственно.

В результате анализа частот генотипов животных по всем исследованным локусам микросателлитов нами установлено, что для изученных популяций характерна общая особенность – дефицит гетерозигот. Более высокий коэффициент инбридинга ($0,222 \pm 0,045$) был отмечен в домашней популяции северного оленя.

В данной работе мы исследовали генетическое разнообразие дикой и домашней форм северного оленя, обитающего на территории России. Большое число аллелей в популяции дикого северного оленя свидетельствует об его уникальном генофонде, который имеет важное значение, не только для сохранения биоразнообразия, но и как источник специфических генетических ресурсов для улучшения важных продуктивных свойств сельскохозяйственных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 14-36-00039.

Изучение распределения микроРНК вокруг митохондриальных генов, ассоциированных с развитием атеросклероза

Тимофеева С.В.

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии имени
Дмитрия Иосифовича Ивановского, Россия, Ростов-на-Дону
timofeeva.sophia@gmail.com*

Сердечно сосудистые заболевания являются основной причиной смертности в развитых странах. В России по официальной статистике смертность от (ССЗ) за 2015 составила 653,9 случаев на 100 тыс. населения. Сердечно-сосудистые заболевания манифестируют как правило в конце жизни, и исторически не были рассмотрены как генетические заболевания, но в последние годы был установлен вклад наследственных факторов. По данным международного исследования GWAS (Genome-Wide Association Studies), выявлено несколько сотен локусов, связанных с поздним началом сердечно-сосудистых заболеваний, включая коронарную болезнь, болезнь сонной артерии, ишемический инсульт, аневризмы аорты, заболевания периферических сосудов, фибрилляции предсердий, нарушений функционирования клапанов, развитием атеросклероза. Эти локусы локализованы как в ядерных так и в митохондриальных генах.

Целью исследования был биоинформационный анализ распространения сайтов связывания микроРНК в окрестностях генов митохондриального генома, полиморфизмы которых ассоциированы с атеросклерозом (Sazonova, e.a., 2016). Исследовали локализацию микро РНК вокруг следующих генов, MT-RNR1 (A750G), MT-RNR2 (A1811G), MT-ATP8 (8516insA/C/AC), MT-ATP8 (8528insA), MT-ATP6 (8930insG), MT-CO3 (G9477A), MT-ND4 (10958insC), MT-ND4 (A11467G), MT-TL2 (A12308G), MT-ND5 (G12372A), MT-ND5 (13047insC), MT-ND5 (13050insC), MT-CYB (C14766T), MT-CYB (A15326G).

Последовательности микро РНК были получены из базы данных NCBI и miRBase с использованием E-utilities API. Поиск мотивов был выполнен с помощью программного пакета MEME Suite. Результаты были отфильтрованы с учетом степени гомологии мотивов 100%.

Выявлена гомологичная последовательность микро hsa-mir-4463 в 13050 положении в митохондриальной ДНК, внутри гена MT-ND5. Дальнейшие исследования позволят проверить экспрессию этой микро РНК в норме и при атеросклерозе. Определение маркеров генетической предрасположенности может расширить понимание патогенеза атеросклероза и послужить основой для поиска новых терапевтических мишеней для его лечения.

Выражаем благодарность научному руководителю, профессору кафедры генетики Т.П. Шкурят.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда научных исследований №15-15-10022.

**Аллельный полиморфизм генов дофаминовой системы (*DRD4* и *DRD2*)
у женщин африканских этнопопуляций**

Фехретдинова Дания Илдусовна, Суходольская Евгения Михайловна

Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

fekhretdinovadaniya@gmail.com

Проявление агрессии в человеческом обществе является одной из важнейших социальных проблем. В связи с этим огромный интерес для науки представляет изучение психогенетики агрессивного поведения.

Цель настоящей работы – изучение генетической вариабельности двух генов дофаминовых рецепторов (*DRD4* и *DRD2*), у женщин в традиционных африканских племенных обществах, характеризующихся разным уровнем культурно допустимой агрессии – хадза и датога.

В данной работе с помощью локус-специфичной ПЦР в женской части популяций хадза (n=158) и датога (n=232) изучался функционально значимый полиморфизм генов дофаминовых рецепторов по типу VNTR (локусы *DRD4Pr* и *DRD4E3*) и SNP (*DRD2 rs1800497*), предположительно ассоциированный с агрессивным поведением.

В промоторной области гена *DRD4* del/ins полиморфизм обуславливает существование двух аллельных вариантов – L и S (240 и 120 п.н., соответственно). Сравнение частот генотипов данного локуса показало достоверные различия между выборками в распределениях гомозигот (P=0.001): частота генотипа L/L выше у хадза (0.386 – хадза, 0.263 - датога), а S/S – у датога (0.152 и 0.254, соответственно). Частоты аллелей также достоверно различались в выборках (P=0.002).

В экзоне 3 гена *DRD4* находится один из наиболее изученных VNTR-маркеров, который представлен повторяющимися последовательностями, длиной 48 п.н., каждая. Распределения аллельных вариантов и генотипов данного локуса в выборках достоверно отличались (P<0.001). Кроме того, датога оказались более полиморфны по данному локусу (8 аллельных вариантов, 17 генотипов), чем хадза (5 аллельных вариантов, 5 генотипов). Выборки значительно отличались по распределениям частот преобладающих генотипов 4/4 и 4/7.

В гене *DRD2* ранее был выявлен SNP, расположенный в 3' - некодирующем регионе, детектируемый рестриктазой *TaqI*. Анализ распределений частот аллелей и генотипов данного локуса выявил достоверные различия между выборками (P=0.025): генотип A1/A1 чаще встречается у хадза (0.152 – хадза, 0.082 - датога), а A2/A2 – у датога (0.323 и 0.405, соответственно).

Мы предполагаем, что различия по распределению частот аллелей и генотипов могут быть обусловлены различными адаптациями к социальной конкуренции в популяциях хадза и датога.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№16-34-00-644, 16-04-00-458) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Анализ ассоциаций по однонуклеотидным полиморфизмам, выявленным на ВТА14 (*Bos taurus*), с оценкой племенной ценности быков-производителей

Харжау Айнур, Сермягин Александр Александрович

ВИЖ имени Л.К. Эрнста, Россия, МО, Подольский р-н, Дубровицы

alex_sermyagin85@mail.ru

Изучение генетической детерминации количественных признаков сельскохозяйственных животных позволило расширить теоретические представления о природе наследования посредством использования анализа полногеномных данных. Благодаря картированию QTL по ряду хозяйственно-полезных качеств крупного рогатого скота установлены консервативные регионы в геноме, которые имеют определенную локализацию на соответствующих хромосомах. Целью исследований являлся поиск генетических маркеров, ассоциированных с оценкой племенной ценности быков-производителей по признакам молочной продуктивности и воспроизводства коров-дочерей. С помощью биочипа Bovine SNP50K v2 BeadChip было прогенотипировано 256 гол. быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород с числом потомков 47998 гол. Племенная ценность быков оценивалась по методу BLUP SM. Контроль качества генотипов и регрессионный анализ проводился в программе Plink 1.07. По результатам анализа было отобрано 41370 SNP. Достоверность ассоциаций оценивали по ожидаемой доле ложных отклонений (FDR, $p < 0,05$). Учитывались показатели удоя, компоненты молока (жир, белок) и сервис-период. Установлено, что наибольшее число генетических мутаций, достоверно связанных с массовой долей жира и продолжительностью сервис-периода, было локализовано на 14 хромосоме в трех регионах. Первый блок гаплотипа размером 403 kb включал пул из 35 генов, при этом только три из них определяли более 8,5% доли аддитивной генетической изменчивости по проценту жира в молоке: *PPP1R16A* (rs109146371), *DGATI* (rs109421300) и *LOC786966* или *PLEC* (rs109350371). Второй и третий блоки были сопряжены с сервис-периодом ($R^2 \approx 7,0\%$) и представлены, соответственно, точечной мутацией внутри гена *TG* (rs110456580) и гаплотипом размером 106 kb, где три полиморфизма были связаны с геном *LOC100299192* (*RPL22L1*): rs109880769 (14 kb upstream), rs55617443 (внутри) и rs109698446 (86 kb downstream). Все выявленные SNP в пределах указанных локусов находились в тесном сцеплении. Полученная информация по функциональным генам позволяет судить об обнаружении на 14 аутосоме крупного рогатого скота ряда значимых регионов, отвечающих как за липидный обмен и синтез молочного жира, так и за овариальную функцию в организме животных.

Поддержано проектом №RFMEFI60414X0062 Министерства образования и науки Российской Федерации.

Применение микросателлитов и участков ретротранспозонов для полилокусного генотипирования геномов крупного рогатого скота разных пород

Хованкина А.В.

ФГБНУ ЦЭЭРБ, Россия, Москва

khovankina@gmail.com

Актуальными задачами интенсификации животноводства является решение таких традиционных проблем, как выявление «генофондного стандарта» пород, разработка и усовершенствование методов геномной селекции. Это требует разработки простых и удобных для интерпретации методов полилокусного генотипирования (геномного сканирования). Использование последовательностей высокополиморфных геномных элементов, таких как микросателлиты, ретротранспозоны, в качестве «якорей» для геномного сканирования может оказаться эффективным для решения данных задач.

В целях выявления межпородной дифференциации выполнено полилокусное генотипирование представителей ряда пород крупного рогатого скота (породы якутская, казахская белоголовая, зебувидный скот, тагильская, красный эстонский скот, голштинская, айширская, черно-пестрая голштинизированная, калмыцкая) с использованием в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (PCR) фрагментов микросателлитных локусов (AG)₉C; (GA)₉C; (GAG)₆C; (CTC)₆C; (AGC)₆G; (ACC)₆G (Inter-Simple Sequence Repeats – ISSR-PCR), а так же участков гомологии к ретротранспозону L1-2_ВТ и длинного концевой повтора (LTR) эндогенного ретровируса ERV1-2C-LTR. Статистическая обработка проводилась в программе GenAlEx v. 6.5 (включая расчет полиморфного информационного содержания - PIC).

Полученные спектры продуктов амплификации фрагментов ДНК (ампликонов), фланкированных инвертированными повторами микросателлитов и участков ретротранспозонов существенно отличались друг от друга и между представителями разных пород. Спектры праймера (ACC)₆G характеризовались наименьшим полиморфизмом у всех исследованных пород, а в спектре праймера (CTC)₆C выявлено лишь 13% полиморфных локусов, причем полиморфных только у айширской породы, в то время как спектры других четырех микросателлитов были полиморфны у всех пород. Доля полиморфных локусов в спектрах праймеров (AG)₉C; (GA)₉C; (GAG)₆C; (CTC)₆C; варьировала у исследованных пород от 7% до 64%. Спектры ампликонов праймеров ретротранспозонов оказались более полиморфными, у исследованных пород доля полиморфных локусов варьировала от 17% до 73%. В среднем у разных пород по спектрам 6-ти микросателлитных праймеров выявлено 21,5% полиморфных локусов, по спектрам, полученных при использовании в качестве праймеров участков ретротранспозонов – 42%. В то же время, спектры ампликонов микросателлитных праймеров, существенно в большей степени вовлекались в межпородные отличия, по сравнению со спектрами праймеров ретротранспозонов. Общий высокий уровень информационного полиморфного содержания спектров последних, по сравнению со спектрами, полученными с микросателлитными праймерами (PIC 0,14 и 0,07 соответственно) свидетельствует об относительно более высокой степени изменчивости геномного распределения ретротранспозонов, фрагменты которых использовались в качестве праймеров, по сравнению с микросателлитными локусами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при изучении межпородных отличий и поисках генофондного стандарта пород эффективной системой для геномного сканирования

являются такие геномные «якоря», как последовательности (AG)₉C; (GA)₉C; (GAG)₆C и (CTC)₆C; для выявления внутривидовой генетической дифференциации – фрагменты ретротранспозонов.

Оценка молекулярно-генетического состава эволюционно консервативных районов контакта X-хромосомы с ядерной оболочкой у малярийного комара

Anopheles atroparvus Thiel

Широкова Вера Владимировна, Артемов Глеб Николаевич

Национально исследовательский Томский государственный университет,

Россия, Томск

vera.shirokova_9@mail.ru, g-artemov@mail.ru

Исследования пространственной организации хромосом играют важную роль в изучении эволюции близких видов. У видов малярийных комаров комплекса «*maculipennis*» были выявлены межвидовые различия в локализации и морфологии районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке в трофоцитах яичников. С помощью окрашивания хромосом антителами к ламину В типа было показано, что у X-хромосомы *An. beklemishevi* имеются четыре района контакта с ядерной ламиной: А, В, С, D (условные обозначения), у *An.atroparvus* – в районах 2В/С, 3А, 3С, а у *An. messeae* 1с, 1d и 2b-с. По результатам FISH микродиссектированных ДНК-проб с хромосомами трофоцитов близких видов районы А *An. beklemishevi*, 2В/С *An.atroparvus* и 2b *An. messeae* гомеологичны и сохранили свойство прикрепления к ядерной оболочке в ходе эволюции. Другие районы, как например, гомейологичные району В *An. beklemishevi* у *An. atroparvus* и *An. messeae* это свойство не проявляют. Целью настоящего исследования было оценить молекулярно-генетическое содержание эволюционно консервативных районов контактов хромосом с ядерной оболочкой на примере района 2В/С *An. atroparvus*. *An. atroparvus* – до сих пор единственный вид малярийный комара из группы *Maculipennis*, геном которого был просеквенирован (Neafsey et al., 2015). С помощью *in situ* гибридизации было определено расположение сайта связывания ламина на физической карте генома этого комара. Район 2С, протяженностью 2 м. п. н., расположен в средней части левого плеча X-хромосомы в районе, морфологически соответствующем типологии диффузного гетерохроматина дрозофилы. В дистальной части этого района расположен участок связывания ламина (2В/С). Определение содержания генов, мобильных генетических элементов и S/MAR последовательностей в районе 2С осуществляли с помощью инструментов Biomart, RepeatMasker, а также данных SMARTest соответственно.

В ходе анализа последовательности района 2С выявлено три участка с высоким содержанием S/MAR элементов, их плотность составляла 1,3% на 100 т.п.н, что в 1,7 раз выше, чем в среднем по району. Общим признаком этих участков являлось обедненность генами - 3,8 гена на 100 т. п. н. (среднее по 2С - 7,33±0,71; по X-хромосоме – 7,16±0,26). Один из этих максимумов, протяженностью около 300 т. п. н., соответствовал сайту связывания ламина в 2В/С и характеризовался максимальной суммарной длиной и числом S/MAR элементов. В пределах данного участка плотность генов составляла 1,3 на 100 т. п. н. Другой его отличительной особенностью являлось низкое содержание как ретротранспозонов - 1 на 100 т. п. н. (среднее по 2С - 4,76±0,53; по X-хромосоме – 4,95±0,22), так отсутствие ДНК-транспозонов (среднее по 2С – 1,24±0,17 на 100 т. п. н.; по X-хромосоме – 1,28±0,07). Таким образом, изучаемый район прикрепления 2В/С по

низкому содержанию генов соответствует характеристикам гетерохроматина, однако он характеризуется практически полным отсутствием мобильных элементов, которые широко представлены в интеркалярном диффузном гетерохроматине у *An. gambiae* (Sharakhova et al., 2010). На основе проведенного анализа можно предположить, что основным способом прикрепления X-хромосомы к ядерной оболочке эволюционно консервативных районов прикрепления, таких как 2В/С является взаимодействие S/MAR последовательностей с белками ядерной ламины. Отсутствие мобильных элементов могло способствовать сохранению этой функции. Дальнейшее изучение молекулярно-генетических особенностей районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке способствует пониманию эволюции пространственной организации хромосом у малярийных комаров.

ГИДРОБИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ЭКОЛОГИЯ

Влияние факторов окружающей среды на развитие зоопланктона притоков Ладожского озера

Алешина Дина Гильмитдиновна

*ФГБУН Институт озероведения РАН, Россия, Санкт-Петербург
aleshina.dinchin@gmail.com*

Притоки Ладожского озера оказывают большое влияние на формирование его водного баланса, гидрохимического состава воды, биоценозов и экологического состояния в целом. Целью работы было изучить качественный состав и количественное развитие зоопланктона основных притоков Ладожского озера, оценить влияние на показатели развития зоопланктон факторов среды и характеристик водосборов рек. Отбор и обработка проб проводилась в 2011-2014 гг. на 19 притоках Ладожского озера и в истоке р. Нева по стандартным методикам. Пробы зоопланктона отбирали с берега на открытых участках без макрофитов путем проливания 100 л воды через коническую сеть Апштейна (газ №70) и фиксировали 40%-м формалином (до разбавления 4,0 %). Гидрохимические показатели были получены при помощи многопараметрического автоматического зонда и в лаборатории. В статистические анализы включалось до 37 показателей (гидрологические, гидрохимические, характеристики водосборов) и численность отдельных видов зоопланктеров, не идентифицированных до вида групп (всего 86 переменных), а также суммарные показатели численности Copepoda, Cladocera и Rotifera. В ходе исследования было выявлено 137 таксонов зоопланктеров рангом ниже рода, из них на долю Rotifera приходилось 56 видов и подвидов (41%), Cladocera – 57 (41%), Copepoda – 24 (18%). Количественные показатели зоопланктона в реках сильно варьировали, но средние значения численности (до 9,6 тыс. экз./м³) и биомассы (до 266 мг/м³) были низкие. Было установлено, что развитие отдельных видов зоопланктона групп Copepoda, Cladocera и Rotifera в реках-притоках Ладожского озера носит стохастический характер. Состав и количественное развитие видов не удалось связать с какими-либо факторами окружающей среды или их комбинацией. На основе состава и численности отдельных видов зоопланктона оказалось невозможно выделить группы сходных притоков Ладожского озера по развитию зоопланктона. Кластеризация рек на основе гидрохимических, гидрологических показателей и характеристик водосбора позволила выделить группы сходных рек, которые формировались устойчиво в разные годы и сезоны. Группы сходных рек выделялись в соответствии с их физико-географическим положением.

О поимке слепого языка *Typhlachirus elongatus* с замечаниями по морфологии и таксономии рода *Typhlachirus*.

Большаков Дмитрий Вячеславович

*Институт Океанологии РАН, Россия, Москва
bolshakov@am-sl.ru*

Семейство Soleidae насчитывает 179 видов, из которых только 2 редких аберрантных вида полностью лишены обоих глаз или же имеют только один сильно редуцированный нижний глаз. В связи с большой редкостью этих рыб заметный интерес представляет наша

поймка в дельте Меконга 3 особей слепого языка *T. elongatus*, ранее известного только по 2 типовым экземплярам из этого же района.

В настоящее время в составе рода *Typhlachirus* выделяют два номинальных вида: это *T. elongatus* и *T. caecus*. Согласно Харденбергу, описанный им *T. caecus* является близким к *Synaptura lipophthalma* Károlí 1882 (= *T. lipophthalmus*) и отличается от него только отсутствием грудного плавника на глазной стороне тела. По Шабано, количество лучей в грудном плавнике варьирует даже у особей из одной пробы, и степень их развития зависит от возраста или пола особи. Равно как и отличия между сравниваемыми видами по высоте тела объясняются возрастной изменчивостью.

Следует добавить, что у наших экземпляров грудной плавник на правой стороне тела отсутствовал, а на левой стороне имелся, но сохранял личиночный характер. Это подразумевает возможность заметных вариаций в числе его лучей и степени редукции лопасти его основания у разноразмерных особей. С учетом этих данных следует признать справедливым сведение Шабано *T. caecus* в синонимию *T. lipophthalmus*.

Особенности внешней морфологии и морфометрические признаки описанных нами экземпляров соответствуют таковым, сообщаемым для *T. elongatus*. Кроме того, наши экземпляры были пойманы в том же районе, что и типовые экземпляры этого вида.

T. elongatus хорошо отличается от *T. lipophthalmus* меньшим числом хвостовых позвонков и лучей в анальном плавнике, тогда как значения большинства их пластических признаков заметно перекрываются. Отметим, что особи этих двух видов были описаны из географически заметно разобщенных районов.

В целом, выявленные нами различия являются достаточными для признания самостоятельными указанных двух видов рода *Typhlachirus* - *T. lipophthalmus* и *T. elongatus*.

Автор искренне признателен научному руководителю д.б.н. С.А. Евсеенко за помощь, оказанную при выполнении работы.

Дифференциация литорали и верхней сублиторали Белого моря с помощью космической съемки.

Вахрамеев Артемий Андреевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

artemiyvakhrameev@mail.ru

Использование дистанционных методов исследований морских прибрежных сообществ, таких как спутниковая многозональная съемка, обладает рядом неоспоримых преимуществ, что особенно значимо для мониторинга окружающей среды. Однако применение спутниковой съемки требует отработки методов достоверной обработки полученных данных и адекватного сравнения их с данными полевых наблюдений.

Целью настоящей работы стало определение степени достоверности дифференцирования основных типов литоральных и сублиторальных сообществ Белого моря с помощью многозональных космических снимков сверхвысокого разрешения.

Районом исследования стала акватория острова Оленевский и губа Грязная Кандалакшского залива Белого моря общей площадью 20 км². В исследовании использовались данные многолетних полевых биотопических исследований на 26 участках района исследования, включающие сведения о биотопе, составе биоты и точные географические координаты. Для биотопического картирования использовались

мультиспектральные снимки, сделанные спутником “Pleiades-B” в мае-июне 2014 года. Методика работы – графическая обработка изображений и статистический анализ данных.

При графической обработке снимков сначала определялись границы литорали: а) в ИК-канале определялась нижняя граница, совпадающая с верхней кромкой толщи воды; б) с помощью визуализации нормализованного разностного вегетационного индекса (NDVI) определялась верхняя граница, совпадающая с кромкой леса.

По интенсивности отраженного ЭМ-спектра в разных каналах определены кривые спектрального образа эталонных станций для каждого типа литорали, и определена степень их сходства с экспериментальными станциями. Всего было выделено четыре типа сообществ – каменистая, каменисто-песчаная, песчаная и илисто-песчаная литораль. Проведена косвенная идентификация биоценозов на основе коэффициента ранговой корреляции Спирмена эталонных и экспериментальных станций.

Показано, что кривые спектрального образа (КСО) эталонных станций в достаточной степени индивидуальны, что позволяет использовать их для дифференциации сообществ. Определение сходства КСО эталонов с КСО экспериментальных станций позволило с высокой степенью достоверности дифференцировать две группы литоральных биоценозов – каменисто-песчаная литораль и илисто-песчаная литораль. Песчаная литораль обладает низким уровнем сходства со всеми остальными типами сообществ литорали. Индекс NDVI позволяет достоверно дифференцировать участки с определенными видами макрофитов.

**Сезонная динамика планктонных водорослей
у правого берега Волжского плеса Куйбышевского водохранилища в 2015 году
Волкова Т.С.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань
t89503145361@yandex.ru*

Куйбышевское водохранилище образовано в результате перекрытия реки Волга плотиной Волжской ГЭС и имеет огромное водохозяйственное и промышленное значение. Для водохранилища характерны глубоководные узкие участки (местами до 40 м), ограниченные высокими берегами, и озеровидные расширения, на которых глубина равномерно увеличивается от левого низкого в сторону правого высокого берега. Из за большой разницы берегов вдоль водохранилища складываются различающиеся гидрологические условия. Это и разные глубины, стоковые и ветровые течения, сгонно-нагонные явления, также высота и интенсивность волн, которые сказываются на условиях существования гидробионтов.

В данном сообщении приведены результаты исследований планктонных водорослей Куйбышевского водохранилища у н.п. Шеланга (правый берег) в вегетационный период 2015 г. Отбор и камеральную обработку проб фитопланктона проводили еженедельно и согласно общепринятым методам (Методика..., 1975; Водоросли ..., 1989).

Весенние процессы в 2015 г. начались активно и быстро. Май и июнь выдались очень теплыми и сухими. Июль и август были дождливыми (150 и 120% от нормы). Причем дожди наблюдались в течение 20 дней июля и носили как обложной, так и ливневой характер.

За период наблюдений в фитопланктоне исследуемого участка было обнаружено 86 таксонов. Наибольшее количество таксонов выявлено в отделах диатомовых (39,53%) и

зеленых (36,05%) водорослей. Другие группы менее разнообразны: сине-зеленые – 9,30%, эвгленовые – 5,81%, золотистые – 3,49% и динофитовые – 3,49%. Средняя численность и биомасса планктонных водорослей в вегетационный период 2015 г. составляли 39,61 млн.кл./л и 7,06 мг/л. Общая численность и биомасса колебались в пределах 0,45-1584,21 млн.кл./л и 0,44-109,35 мг/л. Максимальные количественные показатели были обусловлены массовым развитием сине-зеленых водорослей родов *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* в третьей декаде июля и во второй декаде августа, которые вызвали повсеместно «цветение» воды.

Характеристика видового состава фитопланктона реки Ока в пункте наблюдений г. Дзержинск

Гришанова Юлия Сергеевна

*Южный федеральный университет, Институт наук о Земле,
Россия, Ростов-на-Дону
grishanova.yulia@yandex.ru*

Фитопланктон – важнейший элемент биотической составляющей любой водной экосистемы, активно участвует в различных химико-биологических процессах и формировании качества воды. Индикаторные свойства фитопланктонного сообщества проявляются в изменении качественных (видовой и групповой состав) и количественных показателей его развития.

Загрязнение водной среды влияет на фитоценоз, изменяя его структурные характеристики, что позволяет использовать показатели его развития для оценки качества воды и состояния водной экосистемы.

В основу исследования положены многолетняя режимная гидробиологическая информации о качественных и количественных показателях развития фитопланктона реки Ока за многолетний период (2000-2014 гг.) и материалы из «Ежегодников состояния экосистем поверхностных вод России» (по гидробиологическим показателям). Рассмотрены створы выше и ниже г. Дзержинск.

Анализ данных показал, что фитопланктон реки Ока в пункте наблюдений г. Дзержинск представлен зелеными, диатомовыми, сине-зелеными, пиропитовыми, золотистыми и эвгленовыми водорослями. Среди видов, являющихся доминирующими в исследуемых экосистемах преобладают представители диатомовых водорослей. По таксономическому составу фитопланктон реки Ока в районе г. Дзержинск имеет диатомово-хлорофитовый характер (80,1% и 84,6% соответственно в створах выше и ниже города). В пик цветения водоемов (июль-август) наблюдается увеличение количества сине-зеленых водорослей.

За исследуемый многолетний период не выявлено явной тенденции смены доминирующих видов. Лишь в отдельные годы наблюдается выход на доминирующее положение зеленых водорослей или пиропитовых водорослей.

Таким образом, видовое разнообразие сообщества водной экосистемы реки Ока в целом соответствует характерному для данной территории составу фитопланктона. Но при этом, повышенное развитие сине-зеленых водорослей в летний период косвенно указывает на загрязнение водоема органическими и биогенными веществами и усиление процессов эвтрофирования водотока.

Для подтверждения данного тезиса проведена статистическая обработка многолетних данных по общей численности фитопланктона реки Ока в районе г. Дзержинск. Согласно критериям, представленным в РД 52.24.633-2002, выполнена оценка состояния экосистемы реки по гидробиологическим показателям. Установлено, что состояние исследуемых водных экосистем в пункте наблюдений г. Дзержинск (выше и ниже города) соответствует категории «антропогенное напряжение с элементами эвтрофирования».

Эколого-токсикологическая оценка состояния экосистемы реки Волгуши

Иванова Алина Игоревна

Дмитровский технологический рыбохозяйственный институт

Россия, Дмитровский район, Московская область, Рыбное

frau.alina-2011@yandex.ru

Тяжелые металлы по-прежнему остаются одной из приоритетных групп загрязняющих веществ, имеющих как локальное и региональное, так и глобальное распространение. Их поступление в водную среду связано с природными и антропогенными источниками.

В данной работе представлены результаты исследования, проведенные в 2015 г. по содержанию тяжелых металлов (Cu, Cd, Ni, Pb и Zn, Mn) в воде, донных отложениях и макрофитах в р. Волгуше.

Спектральный анализ позволил выявить следующее. Содержание всех рассмотренных тяжелых металлов в воде р. Волгуши, за исключением никеля (в воде не обнаружен) и кадмия, за весь период исследования превышало ПДК на всех исследуемых станциях. Максимальные превышения ПДК наблюдались в весенний период: свинец в пределах 2,5 – 4, ПДК; цинк - 10 ПДК; марганец -2 ПДК, что связано с поступлением в реку талых вод с водосборной площади.

Летом содержание свинца в воде было в пределах - 2 ПДК, меди - 2 ПДК, цинка -0,7 – 2 ПДК, марганца- в пределах ПДК.

Осенью концентрации свинца в воде возросла и составила 8,5 ПДК; цинка- 2-3 ПДК, марганца -2-7 ПДК; ионы меди в воде не превышали ПДК.

Содержание тяжелых металлов в донных отложениях на всем протяжении реки не превышало ОДК. Донные отложения аккумулируют тяжелые металлы, концентрация их в отложениях на порядок выше, чем в воде. В большей степени из всех исследуемых металлов аккумулируется марганец – 200 - 500 мг/кг, содержание меди в донных отложениях было в пределах 6,3 - 8,6 мг/кг, цинка – 16 - 20 мг/кг, никеля – 4 - 6 мг/кг.

Анализ степени накопления тяжелых металлов макрофитами из разных экологических групп показал, что погруженные макрофиты (элодея канадская, рдест гребенчатый и рдест курчавый) более интенсивно, чем гелофиты, накапливают тяжелые металлы.

Повышенные концентрации тяжёлых металлов в разных компонентах экосистемы р. Волгуши приурочены к участкам реки, находящимся в непосредственной близости автодорог и в зоне влияния стоков с очистных сооружений.

**Остатки водных и наземных беспозвоночных из шерсти мамонта
с реки Аллаиха (Республика Саха, Российская Федерация)**

Изымова Екатерина Ивановна¹, Жаров Антон Александрович²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН,
Россия, Москва

izymova_e@mail.ru, antzhar.ipee@yandex.ru

Исследования фауны беспозвоночных плейстоцена и раннего голоцена неоднократно проводились на "берингийских" территориях, однако, в подавляющем большинстве случаев, внимание уделялось ограниченному числу групп организмов, прежде всего, насекомым. Значительно реже изучали субфоссильных остракод (Crustacea: Ostracoda) и раковинных амёб (Rhizopoda: Testacea). Недавнее исследование шерсти мамонта *Mammuthus primigenius* (?), найденной на р. Большая Чукочья, показало, что включенный материал содержит большое количество остатков многих групп беспозвоночных – как наземных, так и водных.

В данной работе мы представляем результаты анализа материала, извлеченного из шерсти другого мамонта, найденной на р. Аллаиха (левый приток р. Индигирка, Республика Саха). Обнаружены фрагменты покровов Coleoptera (в основном, жука-пилюльщика *Morychus viridis*) и клещей, яйца и мандибулы крупных жаброногих ракообразных (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca и Notostraca), раковины остракод, статобласты пресноводных мшанок *Plumatella* sp., а также эфиппиумы нескольких видов ветвистоусых ракообразных семейства Daphniidae, принадлежащих к двум под родам рода *Daphnia*, в том числе – представители под рода *Daphnia* (*Stenodaphnia*), ныне отсутствующие в северо-восточной Азии. В целом, качественный состав субфоссиальной фауны аналогичен обнаруженному ранее в материале с р. Большая Чукочья, однако были выявлены и некоторые отличия.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о сходстве экологических и тафономических условий в двух районах обнаружения, однако для адекватного сопоставления результатов необходимо проведение радиоуглеродного датирования макроостатков и самой шерсти мамонта с Аллаихи. Разнообразие и обилие остатков беспозвоночных, а также семян и фрагментов вегетативных частей растений в этом материале подтверждают пригодность материала такого рода для проведения комплексных реконструкций палеобиоты. В дальнейшем этот материал будет подвергнут карпологическому, палинологическому анализу, а также изотопному анализу для более полной реконструкции палеосообществ.

Исследование остатков ветвистоусых ракообразных поддержано РНФ (14-14-00778), а больших жаброногих ракообразных, насекомых и прочих беспозвоночных – РФФИ (15-04-08552-а).

Влияние ионов марганца (II) на микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*
Каменец Алексей Федорович, Шилова Наталья Александровна,
Рогачёва Светлана Михайловна

*Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.,
факультет экологии и сервиса, Россия, Саратов*
kamenetsaf@yandex.ru

Наиболее распространенными загрязнителями водоемов являются соединения марганца, которые поступают в поверхностные воды со стоками марганцевых обогатительных фабрик, металлургических заводов, предприятий химической промышленности, а также результате вымывания горных пород и разложения организмов. Актуальной проблемой экологии является определение степени воздействия растворимых соединений марганца на фито- и зоопланктон - первичное звено в трофических цепях.

Целью работы было исследовать влияние хлорида и сульфата марганца (II) в различных концентрациях на численность микроводорослей.

В экспериментах использовалась лабораторная альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda*. Оценку степени воздействия ионов марганца на клетки проводили по стандартной методике биотестирования [ФР 1.39.2007.03223]. Клетки помещали в водные растворы $MnCl_2$ и $MnSO_4$ с концентрациями 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 3 и 10 мг/л, их численность контролировали с помощью камеры Горяева до начала инкубирования и по окончании эксперимента.

Для каждого тестируемого раствора было определено относительное изменение численности клеток *S. quadricauda* по сравнению с контролем. Известно, что при отклонении опытного значения от контроля менее чем на 20 % среда считается не токсичной для клеток, отклонения более 50 % свидетельствуют о проявлении острой токсичности. Установлено, что при инкубировании микроводорослей в растворах хлорида марганца с концентрацией Mn^{2+} 0,001–0,01 мг /л – численность клеток уменьшилась на 7–16 %; при содержании ионов марганца 0,05–10 мг /л – на 24–46 %. В растворах $MnSO_4$ с концентрацией катионов 0,001–0,05 мг/л численность клеток уменьшилась на 7 – 12 %, с концентрацией 0,1-10 мг /л – на 26–45 %. Следовательно, ионы марганца не проявляют острой токсичности по отношению к фитопланктону, но в концентрации более 0,01 мг/л оказывают негативное воздействие на жизнеспособность микроводорослей. Наличие в водной среде анионов хлора усиливает этот эффект.

Таким образом, нами показано, что присутствие солей марганца в водных системах в концентрациях, незначительно превышающих $ПДК_{рх} = 0,01$ мг/л, особенно в сочетании с ионами хлора, может привести к уменьшению содержания фитопланктона, следовательно, к ухудшению кормовой базы рыб и снижению продуктивности водоемов.

Биоиндикация качества воды реки Волгуши по зообентосу

Коротенко Виктория Павловна

Дмитровский технологический рыбохозяйственный институт

Московская область, Дмитровский район, Рыбное

viktoriyakorotenko@yandex.ru

Обширный материал по зообентосу р. Волгуши (бассейн Верхней Волги) позволил оценить качество воды на разных участках реки, используя систему сапробности Пантле и Букк и метод Вудивисса.

Для верховья реки, не подвергающегося биогенному загрязнению, установлена о - сапробная зона (индекс Пантле-Букк равен 1), что соответствует 2 классу качества воды – чистая вода. В пределах нижнего течения прочно устанавливается α и β -мезосапробная зона (индекс Пантле-Букк равен 2,1-3), что соответствует 4 классу качества воды – загрязненная вода.

Расчеты индекса Вудивисса по составу зообентоса на разных участках р. Волгуши дали следующие результаты: в верховье в условиях естественного стока реки индекс был равен 8 (1 - 2 класс качества воды). Ниже, в среднем течении реки индекс равен 6 - 8 (3 класс качества воды, умеренное загрязнение). В нижнем течении биотический индекс равен 5 (4 класс качества воды, загрязненная). Таким образом, оценка качества воды по индексу Вудивисса соответствует результатам оценки методом Пантле-Букк.

Расчеты интегрального индекса экологического состояния экосистемы (ИИЭС) показали состояние «экологического благополучия» р. Волгуши весной на станциях 1, 3 и 5 (ИИЭС – 3,1-3,9) и «экологического кризиса» на станции 2 и 4 (ИИЭС = 2,8-2,9), последнее связано с антропогенной нагрузкой.

В летний период расчеты ИИЭС показали состояние «экологического кризиса» на всем протяжении реки (ИИЭС = 2,5-3).

Осенью в состоянии относительного экологического благополучия находились станции 1 и 3 (ИИЭС = 3,5-3,6), в состоянии экологического кризиса - станции 2,4,5 (ИИЭС = 2,6-3).

В целом по результатам биоиндикационной оценки р. Волгуша относится к умеренно-загрязненной. На протяжении реки встречаются, как относительно чистые участки, так и сильно загрязненные, что объясняется разной степенью антропогенного воздействия.

Показатели жизнедеятельности моллюсков *Planorbella duryi* как тест-функции в токсикологических исследованиях

Кравцова Галина Викторовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

velliri@yandex.ru

В связи с необходимостью комплексной оценки токсического воздействия на различные экологические и таксономические группы организмов, проблема поиска новых тест-объектов остается актуальной. Целью работы стала оценка чувствительности тест-функций пресноводных брюхоногих моллюсков *Planorbella duryi* Wetherby к токсическому воздействию на примере стандартного токсиканта бихромата калия.

Для исследования эффектов токсического воздействия были выбраны концентрации бихромата калия 0,1; 1 и 10 мг/л. В опыте использовали моллюсков двух возрастов из

лабораторной культуры. Наблюдения продолжали 53 дня в случае половозрелых и 26 дней в случае неполовозрелых моллюсков. В качестве тест-функций учитывали выживаемость для обоих возрастов, плодовитость и изменение размеров - только для половозрелых моллюсков.

Бихромат калия в исследованных концентрациях не оказал на выживаемость моллюсков обоих возрастов статистически достоверного влияния за весь период наблюдений. Также, токсикант не оказал статистически достоверного влияния на изменение размеров половозрелых *P. duryi*, что может быть связано с замедлением роста моллюсков с возрастом. При действии наименьшей из исследованных концентраций 0,1 мг/л статистически достоверного влияния на потенциальную плодовитость моллюсков не выявлено, при действии концентраций 1-10 мг/л она была статистически достоверно снижена на 61-63% по сравнению с аналогичным показателем в контрольной выборке. Реальная плодовитость при воздействии всех исследованных концентраций бихромата калия составила от 0,7 до 22,1% от потенциальной. $K_2Cr_2O_7$ в концентрациях 1 и 10 мг/л также вызывал морфологические изменения кладок (деформация кладок и яиц, увеличенная ослизненность, ухудшение адгезивных свойств).

Основываясь на полученных результатах можно сделать вывод, что при использовании *Planorbella duryi* в качестве тест-объекта для биотестирования выживаемость является наименее показательной тест-функцией, так как воздействие бихромата калия в высоких концентрациях не влияло на выживаемость при длительном наблюдении, в том числе у молодых особей. Наиболее чувствительными к токсическому воздействию показателями жизнедеятельности являются плодовитость моллюсков (реальная и потенциальная), а также качество их потомства. В связи с этим, наблюдение за изолированными кладками моллюсков может стать перспективным направлением токсикологических исследований.

Содержание редкоземельных и радиоактивных элементов в растениях сем. Рясковые (*Lemnaceae*) на территории Томской области

Максимова Анна Юрьевна

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Россия, Томск
kuzmen44@mail.ru*

Представители семейства Рясковых (*Lemnaceae* S.F. Gray) – таксономически и экологически изолированная группа водных растений. Они обладают высокой чувствительностью к загрязнению окружающей среды, способны существовать в широком диапазоне природных условий и выдерживать их значительные изменения.

Изучен элементный состав растений из семейства Рясковых, которые были отобраны в водоемах населенных пунктов, располагающиеся в трёх районах Томской области: Томском, Александровском и Кожевниковском.

Содержание химических элементов в макрофите исследовано при помощи инструментального нейтронно-активационного анализа (аналитик – с.н.с. Судыко А.Ф., ТПУ, ГЭГХ), видовая идентификация выполнена О.А.Капитоновой (к.б.н., доцент, УдГУ, Ижевск).

По результатам анализа было установлено, что на территории всех районов Томской области прослеживается идентичная закономерность накопления редкоземельных элементов (РЗЭ) в исследуемых гидрофитах: характерна специфика накопления легких

лантаноидов, преобладание таких химических элементов как La, Ce, Nd. Выстраивается также определенная последовательность районов Томской области по содержанию РЗЭ.

Стоит заметить существенно резкое увеличение La/Yb в Кожевниковском районе, прослеживается линейная зависимость в распределении исследовательских участков относительно данного отношения. Интересно отношение La/Ce, значение которого выше также в Кожевниковском районе. Для данного отношения прослеживается геохимическая закономерность: содержание церия больше, чем лантана; а также линейная зависимость в распределении исследовательских участков.

Содержание Th и U в ряске на территории поселка Осиновка больше на порядок, по отношению к таковому на других исследованных участках. Такая же аномалия наблюдается для отношения Th/U, которое в Осиновке меньше 1, что, возможно, может свидетельствовать о техногенном загрязнении.

Данное исследование показало, что растения из семейства Рясковых способны отражать геохимическую ситуацию окружающей среды, аккумулировать огромный спектр химических элементов, концентрации которых 1-3 раза выше, чем в водоеме, что упрощает получение более объективного представления о распространенности микроэлементов в водной среде.

Значение водоподготовки при культивировании *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900 для целей токсикологических исследований

Мерзеликин Александр Юрьевич

*МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра гидробиологии, Россия, Москва
source45@mail.ru*

Подготовка среды для содержания культур гидробионтов играет важную роль в токсикологических исследованиях, поскольку условия опыта и состояние тест-организмов во многом определяют результаты испытаний. В частности, на воспроизводимости результатов может сказываться сезонное изменение состава водопроводной воды, в то время как состав искусственной среды практически не зависит от сезона.

В качестве тест-объекта были использованы лабораторные культуры *Ceriodaphnia affinis*, одна из которых традиционно содержалась в подготовленной водопроводной (аквариумной) воде, а другая была адаптирована к искусственной среде ADaM. Эксперименты проводили в соответствии с методическим руководством по биотестированию воды РД-118-02-90. Наблюдение за рачками производили до момента их гибели, учитывали количество молоди, размеры рачков на момент половозрелости (4 сутки) и на 39 сутки жизни. Наблюдения проводили в ряду трёх поколений F0, F1, F2. В качестве модельного токсиканта использовали K₂Cr₂O₇ в концентрациях 0,01 и 0,03 мг/л.

Анализ результатов эксперимента показал статистически достоверное увеличение размеров рачков на 4 сутки в ряду поколений (F0 < F1 < F2) в аквариумной воде, и в искусственной среде. Размер на 39 сутки оставался практически неизменным. При сравнении размеров рачков в контрольных выборках на разных средах на один срок наблюдений статистически достоверных отличий не выявлено.

Плодовитость рачков на искусственной среде в F0 была статистически достоверно выше, чем на аквариумной воде, однако в ряду поколений это различие нивелировалось. Средняя продолжительность жизни рачков на искусственной среде также была выше.

При воздействии токсиканта (0,03 мг/л) отмечено статистически достоверное снижение плодовитости в F0 в среде ADaM, а в аквариумной воде эффект воздействия токсиканта отмечен не был.

Можно заключить, что в период проведения эксперимента рачки контрольной выборки на искусственной среде отличались более высокой плодовитостью и продолжительностью жизни, чем рачки на аквариумной воде. Кроме того, в поколении F0 рачки на искусственной среде были более чувствительны к токсическому воздействию. Описанные результаты могут быть связаны с продолжающейся адаптацией культуры к искусственной среде, а также с влиянием сезонных факторов.

Развитие *Scenedesmus quadricauda* и *Monoraphidium arcuatum* в смешанной культуре в присутствии бихромата калия

Михеев Михаил Александрович

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

miheev_m.93@mail.ru

Традиционно в качестве тест-объекта при проведении биотестирования для оценки токсичности веществ используется монокультура, состоящая из одного вида микроводорослей. В России при проведении биотестирования в качестве тест-объекта широко используется микроводоросль *Scenedesmus quadricauda*. На кафедре гидробиологии биологического факультета МГУ была введена в культуру микроводоросль *Monoraphidium arcuatum*.

Целью настоящей работы явилось исследовать влияние бихромата калия на двухвидовую тест-систему, состоящую из представителей одного трофического уровня – двух видов хлорококковых микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. и *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind. Развитие этих видов при совместном культивировании с исходным соотношением численности клеток 1:1 (25 и 25 тыс. кл/мл) изучали в норме и при добавлении бихромата калия в концентрациях 1 и 2 мг/л в течение 30 суток. Культуры выращивали в стандартных условиях на среде Успенского №1. Основные показатели состояния культуры – изменение численности клеток и соотношения живых и мертвых клеток.

В смешанной двухвидовой культуре в накопительном режиме культивирования в контроле (в отсутствие токсиканта) вид *S. quadricauda* оказался более конкурентноспособным и вытеснял вид *M. arcuatum*. Угнетение *M. arcuatum* выражалось в значительном уменьшении количества живых клеток и замедлении темпа их деления, что приводило к снижению численности. При этом рост *S. quadricauda* в смешанной культуре был близок к таковому в монокультуре, а рост *M. arcuatum* в смешанной культуре был подавлен и численность клеток была существенно ниже, чем в монокультуре.

В присутствии бихромата калия вид *S. quadricauda* также доминировал над *M. arcuatum* в течение всего опыта, при этом наблюдались незначительные отличия в развитии *S. quadricauda* в смешанной культуре по сравнению с контрольной смешанной и контрольной монокультурой этого вида. Численность *M. arcuatum* в смешанной культуре при интоксикации находилась или на уровне контроля или ниже по сравнению с контрольной смешанной культурой. *M. arcuatum* в смешанной культуре более чувствительна к токсиканту, чем в монокультуре, что вероятно вызвано сильным угнетением ее развития со стороны *S. quadricauda*.

Влияние неионогенных поверхностно-активных веществ на токсичность солей тяжелых металлов для инфузорий *Paramecium caudatum*

Надеина Александра Алексеевна

*Самарский государственный университет, Россия, Самара
bashmakova1994@inbox.ru*

Одной из серьезных экологических проблем является загрязнение грунтовых и поверхностных вод. Токсичность поверхностно-активных веществ (ПАВ) и солей тяжелых металлов (ТМ), а также особенности их воздействия на гидробионтов определяют актуальность исследований, связанных с изучением активности ПАВ и солей ТМ в воде, а также способности ПАВ изменять степень токсичности ТМ.

Нами было исследовано влияние неионогенных ПАВ (нПАВ) на токсичность солей ТМ для гидробионтов. Для этого были взяты нитраты Cu, Cd, Ni, Pb в концентрациях 0,1, 0,01, 0,001 мг/мл и неионогенные ПАВ Tween 20, Tween 40, Tween 60 в концентрациях 1, 0,1, 0,01, 0,001 мг/мл. В качестве объекта исследования использовались моноклональные линии инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrh., 1838, выделенные из Саратовского водохранилища.

При совместном влиянии нПАВ и нитрата кадмия быстрое снижение численности организмов наблюдается в течение последних часов проведения эксперимента. Кроме того, отмечается изменение формы, скорости и направления движения инфузорий. Максимальное значение коэффициента выживаемости составило 34%. Отметим, что при раздельном влиянии нитрата кадмия и нПАВ значение коэффициента выживаемости составляет 35,33%.

При совместном влиянии нитрата никеля и нПАВ самое высокое значение коэффициента выживаемости составляет 29,67%; при отдельном влиянии нитрата никеля в той же концентрации коэффициент выживаемости составляет 30,67%.

При совместном влиянии нитрата меди и нПАВ наблюдается самый низкий коэффициент выживаемости, что говорит о высокой токсичности такого воздействия. Максимальный коэффициент выживаемости составляет 4,67% (при отдельном воздействии нитрата меди он составляет 5,3%). Высокая смертность наблюдалась уже через час после начала эксперимента.

При совместном влиянии нитрата свинца и нПАВ отмечается более высокая выживаемость (49,33%), чем в экспериментах с другими металлами, что говорит об относительно невысокой токсичности этого соединения для *P. caudatum*. Несмотря на это, нПАВ увеличили токсичность нитрата свинца, так как при отдельном воздействии соли этого металла наивысшая выживаемость составляет 58%.

Сделаны следующие выводы:

1. Нитраты ТМ обладают высокой степенью токсичности. Сила их токсического воздействия возрастает в сочетании с нПАВ, собственная токсичность которых относительно небольшая.
2. Коэффициент выживаемости инфузорий возрастает с уменьшением концентрации вносимых токсикантов.
3. Наиболее сильное токсическое влияние на организмы оказал нитрат меди (как самостоятельно, так и в сочетании с нПАВ); наименьшее - нитрат свинца (как самостоятельно, так и в сочетании с нПАВ).

**Токсичное действие тяжелых металлов на жизнеспособность покоящихся яиц
ветвистоусого рачка *Moina macroscopa***

Оськина Наталия Александровна, Лопатина Татьяна Станиславовна

Институт Биофизики СО РАН, Россия, Красноярск

Oskina_Nata@mail.ru

Покоящиеся яйца планктонных ракообразных образуются в периоды наступления неблагоприятных условий, служат для восстановления популяции рачков. Обычно покоящиеся яйца скапливаются в донных отложениях, где формируют так называемые «банки яиц». Донные отложения также служат местом накопления различных веществ, поступающих в водные экосистемы, в том числе антропогенных токсикантов. Однако воздействие антропогенных факторов на покоящиеся яйца планктонных рачков изучены недостаточно.

Покоящиеся яйца ветвистоусого рачка *Moina macroscopa* подвергали воздействию ряда высоких концентраций (насыщенные растворы и их разбавления) солей меди, цинка, кадмия, никеля. После инкубирования (30 суток, в темноте, при 4°C) в воздействующих растворах, яйца реактивировали, отмечали успешность реактивации и следили за параметрами (ювенильная скорость роста, продолжительность жизни, время первого выводка, количество потомков) жизненного цикла вылупившихся рачков.

Предварительно в остром и хроническом тестах на токсичность были определены полулетальные концентрации меди, цинка, кадмия и никеля для живых рачков *M. macroscopa*. На основе полученных значений тяжелые металлы были ранжированы по степени токсичности в виде следующего ряда: медь>кадмий>никель>цинк. В экспериментах с покоящимися яйцами показано, что высокие концентрации тяжелых металлов не оказывают влияния на выживаемость покоящихся яиц и количество вышедших из яиц животных. Длительное нахождение покоящихся яиц в растворах тяжелых металлов также не влияло на параметры жизненного цикла (соматическую скорость роста ювенильных самок, среднюю продолжительность жизни, количество отрожденных кладок) и расчетные параметры (чистый репродуктивный успех и скорость роста популяции) вылупившихся из них рачков.

Несмотря на то, что концентрации воздействующих на покоящиеся яйца тяжелых металлов в миллионы раз превышали полулетальные дозы этих токсикантов для живых рачков, мы не зафиксировали их токсического влияния на жизнеспособность яиц и вылупившихся из них животных. Полученные результаты могут свидетельствовать о надежной защите (по крайней мере, краткосрочной) покоящихся стадий рачков от действия тяжелых металлов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 15-04-05199.

Влияние постоянного и переменного электромагнитного поля на некоторые биологические параметры пресноводных рачков *Daphnia magna* Straus, 1820

Папоян Геворг Камоевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

geva1391@mail.ru

Электромагнитные излучения из различных природных источников являются фактором, постоянно действующим на все живые на Земле существа. Однако, излучения из антропогенных источников вносят существенное изменение электромагнитного фона как в части интенсивности, так и качественного состава. Низкоинтенсивное электромагнитное излучение антропогенного происхождения может быть причиной разнообразных биологических эффектов, в связи с чем целью работы было исследование влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения радиочастотного диапазона на пресноводных рачков *Daphnia magna* Straus, 1820.

Облучение рачков проводили ЭМП с частотой 30 МГц и напряженностью магнитного поля $H=0.44$ А/м в двух режимах: непрерывном и режиме амплитудной манипуляции выходного сигнала меандром с частотой 50 Гц, при котором периоды излучения ЭМП с постоянной амплитудой чередуются с такими же по длительности периодами без излучения. Для выявления отдаленных последствий облучения были проведены опыты на четырех поколениях дафний (Р – F₃). Периоды экспозиции в каждом из этих экспериментов составляли 10, 100, 1000 и 10000 секунд.

Результаты эксперимента показали, что облучение рачков постоянным ЭМП в течение 10000 с вызвало статистически достоверные изменения суммарной плодовитости в поколениях F₂ и F₃ (123 и 143 % от контроля соответственно). Кроме того, воздействие ЭМП на *D. magna* выявило появление особей с различными аномалиями в развитии в потомстве всех поколений. Численность и характер распределения особей с дефектами в развитии отличались как от поколения к поколению, так и в пометах поколений Р - F₃.

Обнаруженные аномалии у особей рачков в обоих режимах воздействия отличались также по затронутым органам и частям тела. Аномалии, затрагивавшие строение карапакса, а также плавательных антенн снижали выживаемость рачков, в то время как дефекты, затрагивавшие зрительный аппарат и хвостовую иглу на выживаемости рачков *D. magna* никак не сказывались.

Таким образом, показано, что низкоинтенсивное ЭМП радиочастотного диапазона может оказывать значительное влияние на биологические параметры рачков *Daphnia magna* в ряду поколений.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РФФИ (проект №14-25-00055).

Эффекты низкоинтенсивного радиочастотного воздействия сотовой связи на регенерационную и пролиферативную активность двух видов планарий

Ускалова Дарья Вадимовна

Обнинский институт атомной энергетики НИЯУ МИФИ, Россия, Обнинск

uskalovad@mail.ru

Низкоинтенсивное радиочастотное излучение широко используется в радио- и телекоммуникационной связи. Санитарно-гигиеническое нормирование излучения от базовых станций и аппаратов сотовой связи осуществляется согласно действующим в

России стандартам. Однако на данный момент отсутствует единое мнение о механизмах биологического действия и опасности влияния радиочастотного излучения на природные экосистемы.

В работе проведены лабораторные исследования влияния 5-кратного превышения электромагнитного излучения (ЭМИ) от базовых станций сотовой связи (900 МГц, плотность потока энергии $0,5 \text{ Вт/м}^2$, ПДУ для человека $0,1 \text{ Вт/м}^2$) на изменение регенерационной и пролиферативной активности двух видов планарий *Dugesia tigrina* и *Schmidtea mediterranea*. Данные виды длительно культивируются в нашей лаборатории в стандартных условиях и являются широко используемыми в экотоксикологии и биомедицине тест-объектами. В эксперименте применили установку, состоящую из генератора непрерывного электромагнитного излучения P2-52 и антенны в виде пирамидального рупора с фокусирующей линзой 25x25 см. Планарий размером 8–10 мм облучали в пластиковых чашках Петри диаметром 4 см в 5 мл культуральной воды по 10 особей на пробу в течение 1, 2 и 3 ч. Контроль находился в тех же условиях, но без облучения. Проведено три серии независимых экспериментов.

Для оценки регенерационной активности применен метод прижизненной компьютерной морфометрии и программа «Морфометр Image-pro». Оба вида планарий являются ярко пигментированными, а отрастающая бластема в течение 3-10 сут пигмента не образует. Декапитацию проводили перед облучением. Регенерационную активность оценивали по соотношению площади отрастающей бластемы к площади планарии через трое сут после декапитации и облучения в электромагнитном поле (ЭМП) сотовой связи. Обнаружено, что через 2 ч экспозиции регенерационная активность планарий снижается на 40 %. При увеличении экспозиции до 3 ч негативный эффект остается на том же уровне. При часовой экспозиции эффект не выявлен. Следовательно доза воздействия ЭМИ 3600 Дж/м^2 (экспозиция примерно 2 ч) может являться пороговой. Более детальный анализ доз в интервале экспозиции от одного до двух часов позволит уточнить пороговый диапазон.

Регенерация планарий связана с пролиферативной активностью стволовых клеток (необластов). В норме популяция необластов неоднородна – более 50% находятся в фазе G1 клеточного цикла, 40% – в фазе G2 и 3–5% – в G0 фазе. Изучение пролиферативной активности облученных и контрольных планарий проведено на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BDIS, США). Стандартная методика модифицирована нами с учетом особенностей клеточных популяций *D. tigrina* и *S. mediterranea*. У первого вида обнаружены популяции двух типов клеток – диплоидных и триплоидных, учет которых на цитометре приводил к перекрыванию пиков, что осложняло анализ результатов влияния радиочастотного воздействия на организм. Препараты *S. mediterranea* давали хорошие для анализа пики, что определило выбор данного тест-объекта для изучения пролиферативной активности. Полученные результаты изменения пролиферативной активности коррелировали с нарушением регенерационной активности планарий, экспонируемых в ЭМП с параметрами сотовой связи.

Полученные результаты расширяют не только представление о механизмах биологического действия радиочастотного излучения, но и имеют практический интерес. Планарии *S. mediterranea* могут быть использованы в качестве тест-объекта для анализа влияния радиационного фактора на организм.

**Температурные реакции двух видов пресноводных циклопов –
Cyclops strenuus (Fisher, 1851) и *Thermocyclops crassus* (Fisher, 1853)**

Шилова Анастасия Алексеевна

ФГБОУ ВПО «Череповецкий государственный университет», Россия, Череповец
ira2323232@rambler.ru

Знание тепловых предпочтений водных беспозвоночных важно, так как температура – главный фактор, имеющий прямое влияние на физиологию эктотермов, они реагируют на тепловые изменения окружающей среды, избегая смертельных температур и избирая оптимальные температурные интервалы. Эти данные позволяют рекомендовать температурные критерии жизнедеятельности циклопов в качестве важных параметров, позволяющих анализировать, прогнозировать и выполнять экспертную оценку при решении различного рода научных, природоохранных и рыбохозяйственных задач.

Для опыта брали два вида циклопов: холодноводный - *Cyclops strenuus* и тепловодный - *Thermocyclops crassus*. В ходе исследования применяли метод Ф. Фрая при определении конечного преферендума и методом критического теплового максимума (КТМ) при определении теплоустойчивости. Работы проводились в лаборатории экспериментальной экологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Таким образом, по характеру распределения гидробионтов в условиях термоградиентной установки можно с высокой степенью достоверности рассчитать ряд характерных температурных зон на шкале термотолерантности вида. Полученные различия в уровнях КТМ у холодноводного вида *C. strenuus* (32.6 ± 0.52) и летнего тепловодного вида *T. crassus* (40.55 ± 0.51) хорошо соотносятся с особенностями их экологии жизни и развития. Выход на конечное температурное избирание у обоих исследованных видов происходит на 7-8 сутки с начала тестирования, но у *C. strenuus* этот процесс идет с перерегулированием, а у *T. crassus* – по экспоненте. Конечные избираемые температуры *C. strenuus*, совпадающие с оптимальными значениями, определены в диапазоне 5-17 °С, температурная зона нормальной жизнедеятельности – в диапазоне 3-21 °С, пессимальные температуры от 0-2 до 24-30 °С. У *T. crassus* конечные избираемые температуры и оптимальные значения колеблются в диапазоне от 25 до 30 °С, температурная зона нормальной жизнедеятельности – в диапазоне 23-31 °С, пессимальные температуры от 0 до 22 °С.

Таким образом, значения КИТ отличаются у тепло- и холодолюбивых видов циклопов, а разница КИТ у циклопов внутри семейства может быть как существенной, так и незначительной.

ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Анатомия и гистология *Novocrania* sp.

Гебрук Анна Андреевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
isil.narma@gmail.com

История изучения реликтовой группы морских беспозвоночных животных, брахиопод (*Brachiopoda*), отличается исключительной неравномерностью: если многочисленные ископаемые виды описаны весьма детально, то морфология, ультраструктура и развитие рецентных представителей группы исследованы крайне плохо. В то же время, понимание особенностей анатомической организации и развития современных брахиопод, особенно примитивных представителей типа, позволит ответить на фундаментальные вопросы эволюции плана строения брахиопод и филогении группы. В этой связи детальное изучение анатомической организации примитивных представителей *Brachiopoda* является актуальным. Объектом работы послужили представители примитивной группы беззамковых брахиопод, принадлежащие роду *Novocrania* Lee, Brunton, 2001. Используемые в работе методы гистологической техники и 3D реконструкций позволили выявить у исследуемого вида некоторые уникальные особенности морфологической организации, отличающие его от других представителей рода. Так, у исследуемого вида печеночные выросты желудка занимают переднее латеральное положение, тогда как у большинства видов рода они локализируются на дорсальной стороне желудка и, как правило, смещены к его задней части. У изученного вида имеется необычный объемистый слепой вырост задней кишки. *Novocrania* sp. имеет обширный околопищеводный целомический синус, ранее не описанный для беззамковых брахиопод. Туловищный целом подразделен на правую и левую половины неполным дорсальным мезентерием. В туловищном целом имеются короткие гастропариетальные мезентерии. Организация нервной системы *Novocrania* sp. нетипичная для краниид в частности и брахиопод в целом: главный нерв лофофора не выражен, добавочный брахиальный нерв чрезвычайно мощно развит и дает начало поперечным нервным трактам, проходящим в толще соединительной ткани и соединяющим добавочный и нижний брахиальные нервы. Обнаруженные особенности строения позволяют рассматривать изученный вид как новый для науки. Колокализация целомических компартментов друг относительно друга и относительно пищеварительного тракта, а также расположение основных диссепиментов и мезентериев у *Novocrania* sp. ставит под сомнение валидность «гипотезы складывания», которая в настоящее время является общепринятой и объясняет формирование плана строения современным брахиопод в результате складывания предкового организма на брюшную сторону.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда научных исследований (проект № 14-04-00262 – гистологические исследования; проект № 14-50-00029 – 3D реконструкции).

Ядерный аппарат синдермиса скребней *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala: Echinorhynchidae)

Дюмина Александра Викторовна

Кафедра Зоологии РГПУ имени А. И. Герцена, Россия, Санкт-Петербург

D_Alexia@mail.ru

Синдермис скребней разделён на две клеточные территории, приуроченные к основным отделам тела – пресоме и метасоме. Считается, что для представителей класса *Paleacanthocephala* Meyer, 1931 характерна фрагментация ядер покровного синцития пресомы и метасомы. Мы предприняли первую попытку реконструировать объёмную структуру ядерного аппарата синдермиса *Echinorhynchus gadi* Мyller, 1776.

Нами были исследованы 20 особей вида *E. gadi*, извлечённых из кишечника *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 (Кандалакшский залив Белого моря). 15 экземпляров от 10 до 35 мм, самцы и самки, были окрашены красителем Ноеchst по стандартному протоколу. Микроскопирование проведено на микроскопе Leica TCS SP5 MP. Полученные изображения были обработаны в программе ImageJ. 5 особей были зафиксированы в жидкости Буэна. Были получены серии поперечных срезов, окрашенных гематоксилином Эрлиха. Полученные срезы сфотографированы с помощью камеры Nikon DS-Fi1 (на микроскопа Leica DM 2500). Фотографии обработаны в графическом редакторе Amira 5.2.0.

В синдермисе метасомы ядра равномерно распределены по всему объёму покровов. Размеры ядер варьируют в пределах от 1 до 6 мкм, их форма разнообразна - встречаются округлые, эллипсоидные, лопастевидные и сильно разветвлённые ядра. В покровах хоботка и шейки ядер не обнаружено, ядерный аппарат синдермиса пресомы локализован исключительно в лакунарной системе лемнисков. Ядра лемнисков крупные, лопастные, залегают в каждом лемниске по одному, их разветвлённая форма повторяет форму сети лакун.

У представителей вида *E.gadi* ядерный аппарат синдермиса пресомы и ядерный аппарат синдермиса метасомы имеют разную организацию. Для клеточной территории метасомы характерны небольшие, разнообразной формы многочисленные ядра, локализованные в толще покровного синцития. Но в синдермисе пресомы одиночные крупные разветвлённые ядра вынесены в производные покровов лемниски. Таким образом, лемниски представляют собой цитоны покровного синцития пресомы.

Автор выражает свои благодарности администрации Кандалакшского государственного заповедника за предоставленную возможность осуществлять сбор материалов. Также хотелось бы поблагодарить Захаренкову Анну Сергеевну, Ищенко Илью Сергеевича и Кремнёва Георгия Артуровича за активную помощь при сборе и фиксации материалов. Особая благодарность - Добровольскому Андрею Александровичу, без руководства которого данная работа не была бы осуществима.

**География почвообитающих энхитрид (*Annelida, Oligochaeta, Enchytraeidae*)
в лесах Европейской части России**

Дегтярёв Максим Игоревич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

degtyarevmi@gmail.com

Благодаря высокой плотности популяций, а также высокой метаболической активности энхитриды (*Enchytraeidae*) играют важную роль в почвах многих наземных экосистем, в том числе лесных. Важной задачей является выявление закономерностей распределения энхитрид в лесах Европейской части России.

Пробы почвы для экстракции энхитрид были отобраны в апреле-июне 2015 года в лесах в пяти различных экорегионах Европейской части России: Крымско-Кавказском (Краснодарский край, субсредиземноморские леса), Днепровско-Поволжском (Воронежская и Липецкая области, широколиственные леса), Смоленско-Приуральском (Московская и Тверская области, южная тайга), Прибалтийско-Ветлужском (Карелия и Ленинградская область, средняя тайга) и Кольско-Карельском (Мурманская область, серверная тайга). В каждом экорегионе отобрано по 4 участка в лесах зонального типа, на каждом из которых отобрано по 5 проб буром диаметром 5 см (всего 100 проб). Для экстракции энхитрид был использован метод влажных воронок (ISO/WD 23611-3).

Численность энхитрид составляет 610 ос./м² в Крымско-Кавказском экорегионе, 1910 в Днепровско-Поволжском, 4180 в Смоленско-Приуральском, 1300 в Прибалтийско-Ветлужском и 230 в Кольско-Карельском. Число родов энхитрид всюду невелико: 1 род в Крымско-Кавказском экорегионе, по 4 в Днепровско-Поволжском и Смоленско-Приуральском, 2 в Прибалтийско-Ветлужском и 1 в Кольско-Карельском. В Крымско-Кавказском и Днепровско-Поволжском экорегионах доминируют представители рода *Fridericia* (91,7% и 58,7% соответственно). В Днепровско-Поволжском регионе важную роль играют также представители рода *Enchytraeus* (29,3%). В Смоленско-Приуральском, Прибалтийско-Ветлужском и Кольско-Карельском экорегионах доминируют энхитриды рода *Cognettia* (90,2%, 66,7% и 88,9% соответственно). В Прибалтийско-Ветлужском экорегионе высока доля представителей рода *Achaeta* (33,3%).

Полученную численность энхитрид следует считать достаточно низкой во всех экорегионах, учитывая то, что поздней весной в умеренном климате численность энхитрид достигает своего пика, и приводимые в литературе данные превышают полученные в данной работе значения. Вероятной причиной этого может быть низкая эффективность использованных воронок. В численности и родовом разнообразии энхитрид прослеживается широтная закономерность.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда № 14-14-00894.

Микроскопическая анатомия осевого комплекса органов и прилежащих структур морского ежа

***Strongylocentrotus pallidus* Sars, 1871 (Echinodermata, Echinoidea)**

Егорова Екатерина Алексеевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
ekaterina.a.lavrova@gmail.com*

Осевой комплекс органов является одной из наиболее характерных черт организации иглокожих. Описания его строения в литературе противоречивы, а гомологизация всего комплекса и отдельных его частей проблематична.

В ходе работы методами гистологической техники переисследована микроскопическая анатомия осевого комплекса органов морского ежа *S. pallidus*.

Структуры осевого комплекса органов *S. pallidus* группируются вокруг каменистого канала, связанного через ампулу мадрепорита с осевым целомом и внешней средой, а через оральное амбулакральное кольцо - с амбулакральной системой. С аборальной стороны к осевому целому примыкают замкнутые перикардиальный и половой целома. На оральной стороне осевой целом заканчивается слепо. Осевой орган представляет собой сплетение кровеносных сосудов, тянущееся от аборальной стенки тела через осевой и перикардиальный целома к оральному кровеносному кольцу. С осевым органом также связаны кровеносные сосуды гонад и кишечника. Оральное кровеносное кольцо *S. pallidus* разделяется на два: одно залегает между периоральным и амбулакральным, а другое - между периоральным и соматоцельным перигемальным целомическими кольцами.

Усложнение структуры периорального целома *S. pallidus*, окружающего аристотелев фонарь, приводит к перестройке околотетовых участков комплекса. Сосуды кишечника и кишечный кровеносный плексус *S. pallidus* гомологичны желудочному кровеносному кольцу Asteroidea и Ophiuroidea. От кишечного плексуса к осевому органу проходят кровеносные сосуды, гомологичные гастрическим кровеносным пучкам морских звёзд и офиур. Половой целом *S. pallidus* не сообщается с другими целомами, хотя в литературе упоминается о его связи с осевым целомом. У *S. pallidus* отсутствует аксоцельное перигемальное кольцо, в результате чего осевой целом на своем оральном конце замыкается слепо.

Таким образом, осевой комплекс органов *S. pallidus* устроен по тому же общему плану, что и у ранее изученных нами представителей Asteroidea и Ophiuroidea: *Asterias rubens* Linnaeus 1758 и *Ophiura robusta* Ayres, 1854.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-34-00460 мол_а.

Микроскопическая анатомия осевого комплекса органов и прилежащих структур голотурии *Chiridota laevis* Fabricius 1780 (Echinodermata, Holothuroidea)

Ершова Наталия Алексеевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра зоологии беспозвоночных, Россия, Москва
NAEshova@mail.ru*

Класс Holothuroidea занимает неоднозначное положение в системе типа Echinodermata. По одним данным, он считается наиболее прогрессивной группой, по другим – наиболее базальной. В этой связи большое значение приобретает анализ

морфологических структур иглокожих, в частности – устройство осевого комплекса органов, который является одной из синапоморфий иглокожих. Данные по морфологии осевого комплекса органов голотурий не пересматривались в течение почти ста лет и требуют переизучения современными методами.

Целью данного проекта было изучение микроскопической анатомии осевого комплекса органов и прилежащих к нему структур голотурии *Chiridota laevis* (Apodida) и проведение трехмерной реконструкции. Материал был собран в окрестностях ББС МГУ и зафиксирован в формалине и 70%-ный этиловом спирте. Было изготовлено и изучено 6 серий гистологических срезов: 5 поперечных и 1 сагиттальная.

Нам удалось провести детальную трехмерную реконструкцию строения осевого комплекса органов голотурии *C. laevis* и выявить ряд отличий от исследованных нами прежде видов других классов иглокожих.

К таким отличиям относится исчезновение правого аксоцеля, который у других иглокожих группы Eleutherozoa преобразуется в перикардиальный целом. Левый аксоцель сливается с гипогастрическим целомом левым соматоцелом и формирует общий перивисцеральный целом. Из-за редукции аксоцелей практически полностью редуцируется осевой орган, который остаётся только виде гемоцельной муфты вокруг каменистого канала, непосредственно связанной с кровеносной лакуной гонады. Также для *C. laevis* свойственно отсутствие радиальных амбулакральных каналов и радиальных кровеносных каналов. Выяснено, что у *C. laevis* каменистый канал открывается во внешнюю среду единственной порой мадрепорита на оральной стороне тела в интеррадиусе CD, в отличии от большинства голотурий. Наличие поры каменистого канала на оральной стороне тела сближает голотурий с офиурами. Есть основания полагать, что единственная пора в мадрепорите – первичное состояние, являющееся базальным для иглокожих, у личинок которых имеется единственный гидропор, который затем и преобразуется в пору мадрепорита.

Нами было показано, что, в противоречие литературным данным, у исследуемого нами вида целомы щупалец не сообщаются с амбулакральным кольцом. В амбулакральное кольцо впадают только полиевы пузыри и каменистый канал.

Строение яичников марит *Haplometra cylindracea* Zeder, 1800, *Cryptocotyle lingua* Lühe, 1899 и *Neophasis lageniformis* Lebour, 1910 (Neodermata: Trematoda)

Кремнев Георгий Артурович

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
ekremnyov@yandex.ru

Сравнение репродуктивных органов трематод: яичников марит и герминальных масс партенит необходимо для выяснения природы жизненного цикла, присущего представителям этого таксона.

Материал собран летом 2015 года. Мариты *Haplometra cylindracea* Zeder, 1800 (Plagiorchiidae) добыты из *Rana* sp. (Ленинградская область), *Cryptocotyle lingua* Lühe, 1899 (Heterophyidae) — из *Sterna paradisaea* (Белое море), *Neophasis lageniformis* Lebour, 1910 (Acanthocolpidae), — из *Anarhichas lupus* (Белое море). В работе использованы стандартные гистологические и светооптические методы.

В яичниках обследованных видов марит обнаружены оогонии, созревающие ооциты первого порядка и структурные клетки. Различия размеров оогониев и ооцитов

максимальны у *N. lageniformis* ($5,3\pm 0,06$ и $2,8\pm 0,04$ μm , соответственно), менее выражены у *C. lingua* ($3,3\pm 0,03$ и $1,8\pm 0,03$ μm) и минимальны у *H. cylindracea* ($1,6\pm 0,02$ и $1,1\pm 0,02$ μm). В ядрах оогониев преобладает гетерохроматин, ядрышко не оформлено. Ядра ооцитов прозрачные, с небольшими тяжами гетерохроматина, крупным ядрышком. Спирализация хроматина в ядрах структурных клеток равномерная. Базофилия цитоплазмы увеличивается в ряду от оогониев до зрелых ооцитов.

Распределение половых клеток яичников *N. lageniformis* и *C. lingua* гетерополярное. На полюсе, противоположном овикапту находятся оогонии. По направлению к овикапту лежат созревающие ооциты. Наличие внутри яичника *H. cylindracea* нескольких гониальных зон, ограниченных крупными структурными клетками, нарушает его строгую полярность.

Организация яичников мариит из разных таксономических групп различается. Расположение клеточных элементов яичников *N. lageniformis* и *C. lingua* сходно с распределением клеток гетерополярных герминальных масс, характерных для изученных эхиностоматидных редий. Такое строение герминальной массы считается архаичным. Распределение клеточных элементов во флотирующих герминальных массах партенит продвинутых групп (*Plagiorchidae*, *Strigeidae*) концентрическое. При сохранении общей гетерополярности яичника *H. cylindracea*, наблюдается концентрическое расположение клеточных элементов в его функциональных зонах. По-видимому, особенности репродуктивной динамики яичников мариит определяют сходство их организации с герминальными массами партенит.

Особенности ультраструктуры покровов веслоногих ракообразных в связи с переходом к паразитическому образу жизни

Купаева Дарья Михайловна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

d.kupaeva@gmail.com

Веслоногие ракообразные (*Crustacea* Brünnich, 1772: *Copepoda* Milne-Edwards, 1840) - многочисленная группа морских беспозвоночных. Они заселили практически все экологические ниши водной среды и перешли к обитанию в симбиозе с разнообразными беспозвоночными и позвоночными животными. Покровы представителей также отличаются разнообразием строения. Однако анализ особенностей строения покровов в связи с их таксономическим положением и переходом к паразитированию на животных разных таксонов проведен не был.

При выполнении работы проведен анализ и систематизация опубликованных данных по ультраструктуре покровов копепод, а также использованы оригинальные результаты, полученные с применением ТЭМ и СЭМ для глубоководных представителей предположительно нового семейства.

В результате проведенных работ составлена оригинальная таблица и проанализированы общие и отличительные особенности строения кутикулы у представителей 35 видов 26 семейств семи отрядов копепод, проявляющих значительное разнообразие строения. Так, показано, что представители отряда *Harpacticoida* Sars M., 1903 характеризуются типичным для ракообразных строением кутикулы, состоящей из многослойной эпикутикулы и двух слоев прокутикулы. Для паразитических копепод характерны либо редукция кутикулы (уменьшение числа слоев эпикутикулы и редукция

прокутикулы, при которой может наблюдаться возникновение микроворсинок), либо, напротив, ее утолщение.

Проведенный анализ позволил наметить направление дальнейших работ и показал, что кутикула веслоногих ракообразных проявляет значительное разнообразие в строении. Также показано, что представители разных отрядов *Poecilostomatoida* Burmeister, 1835, *Siphonostomatoida* Thorell, 1859 и *Cyclopoidea* Burmeister, 1835) проявляют сходные черты строения кутикулы, возникшие при переходе к паразитическому образу жизни.

Морфофункциональный анализ пищедобывательного аппарата двух видов голожаберных моллюсков

Михлина Анна Леонидовна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра зоологии беспозвоночных, Россия, Москва
azzarika@gmail.com*

Голожаберные моллюски (Nudibranchia) – это крупный отряд класса Gastropoda, отличающийся удивительным морфологическим и биологическим разнообразием, в том числе разнообразием спектров питания. Эволюция голожаберных моллюсков проходила в тесной связи с выбранным пищевым объектом и, соответственно, с типом питания. Сравнение механизмов питания и строения пищедобывательного аппарата голожаберных моллюсков разных подотрядов в связи с их положением на филогенетическом древе позволит проследить трансформационный ряд пищедобывательных аппаратов и сделать выводы о путях эволюции и преобразования данного комплекса органов внутри группы.

Особи *Flabellina verrucosa* (M.Sars, 1829) (Nudibranchia: Aeolidida) были собраны в июне-сентябре 2013-2015 годов в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова. Особи *Vayssierea elegans* (Baba, 1930) (Nudibranchia: Doridacea) были собраны в августе-сентябре 2015 года неподалеку от морской биологической станции «Восток» Института биологии моря. Изучение строения пищедобывательного аппарата проводилось с помощью световой микроскопии, а также сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии; также были построены трехмерные реконструкции буккального комплекса органов для этих видов моллюсков.

В результате исследований были выделены основные группы мышц, входящих в пищедобывательный аппарат *F. verrucosa* и *V. elegans* и выделены отличительные особенности строения пищедобывательного аппарата представленных двух видов моллюсков. Для *F. verrucosa* одной из важных черт является отсутствие внешней буккальной мускулатуры, а у *V. elegans* показано наличие кислых желез в ноге, секрет которых растворяет трубки полихет, и практически полная редукция одонтофора. Радула *F. verrucosa* функционирует как измельчитель; радула *V. elegans* приспособлена для сверления.

На основании полученных данных по морфологии пищедобывательного аппарата были предложены механизмы питания для данных видов голожаберных моллюсков: сосущо-измельчающий для *F. verrucosa* и сверляще-сосущий для *V. elegans*.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 15-04-02580 и № 16-34-00955, а также гранта Президента № 08-01-15.

**Баркодинг и филогенетические взаимоотношения между диплостомами
(Trematoda: Diplostomidae) Беларуси**

Можаровская Людмила Валентиновна

Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

*Московский педагогический государственный университет, Россия, Москва
milamozh@yandex.ru*

Среди плоских червей-трематод особый эпизоотологический интерес вызывают представители сем. *Diplostomidae*, являющиеся возбудителями диплостомозов рыб и птиц. Диплостомы характеризуются триксенным жизненным циклом, со сменой трех хозяев: промежуточного (пресноводные моллюски), дополнительного (рыбы) и дефинитивного (рыбоядные птицы). Семейство включает до 40 видов, однако их высокая морфологическая изменчивость на всех стадиях жизненного цикла затрудняет идентификацию и таксономическое определение. С этой точки зрения наиболее эффективным инструментом является генетический «баркодинг», применяемый для идентификации видов с помощью последовательности митохондриального гена *cox1*.

В настоящей работе определены последовательности фрагмента *cox1* (398 п.н.) у церкарий, метацеркарий и марит трематод рода *Diplostomum*, собранных в двух водоёмах Республики Беларусь (оз.Нарочь, р.Припять). ДНК выделяли из 13 церкарий, паразитирующих на пресноводных моллюсках родов *Lymnaea* и *Radix*; 19 метацеркарий, инфицирующих 12 видов карповых рыб (сем. *Cyprinidae*); 5 марит, обнаруженных в кишечнике утиных птиц (*Anas platyrhynchos*) и чаек (*Larus canus*, *L. ridibundus*). Для сравнения использованы 70 известных последовательностей *cox1*, принадлежащих к 10 валидным и 14 неидентифицированным видам и линиям диплостом Евразии и Сев.Америки. На основании филогенетических реконструкций показано, что исследуемые изоляты принадлежат видам: *D.pseudospathaceum*, *D.spathaceum* (церкарии, метацеркарии и мариты), видовому комплексу *D.mergi* (метацеркарии известной линии *mergi1* и обнаруженной нами новой линии “*mergi B*”), а также к трем исландским линиям (видам) LIN2, LIN4, LIN6 (церкарии и метацеркарии). Обсуждаются особенности жизненных циклов, филогенетические связи и возможные пути трансмиссии диплостом Евразии.

Работа финансирована грантом РФФИ №14-14-00832.

**Общая морфология и ультратонкое строение циркуляторной системы
Aplacophora (Mollusca) на примере *Cristallophrison nitens***

Надуваева Елизавета Васильевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
liza.naduvaeva@mail.ru*

Исследования организации полости тела важны для понимания морфологического разнообразия и выяснения родственных связей между многими группами беспозвоночных животных. Высказано несколько гипотез происхождения *Bilateria* (плануло-турбеллярная, архицеломатная, метамерная и т.д.), с помощью которых исследователи пытаются объяснить пути развития и эволюции полости тела беспозвоночных животных. Изучение *Aplacophora*, наиболее примитивных представителей группы моллюсков, базальное положение которых было подтверждено в ряде современных молекулярно-генетических работ, позволит получить достоверный материал для качественного сравнительно-анатомического анализа организации полости тела моллюсков в целом и других *Bilateria*.

Aplacophora - небольшой класс моллюсков с двусторонней симметрией, обладающий рядом специфических черт, таких, как червеобразное тело, лишенное раковины, покрытое кутикулой и известковыми склеритами, частичная редукция ноги. По данным молекулярной филогенетики аплакофоры вместе с полиплакофорами формируют наиболее примитивную группу моллюсков - Aculifera.

В настоящем исследовании помимо классических морфологических методов - световой и электронной (сканирующая) микроскопии, применен метод трехмерной компьютерной реконструкции, который позволил точно установить местоположение внутренних органов и полостей.

Основным результатом данной работы является полная серия поперечных срезов *Cristallophrison nitens*, на основе которой с помощью программы Imaris 7.0.0 была построена трехмерная реконструкция его гоноперикардиальной системы. Наши данные показали сходство циркуляторных систем хитонов и аплакофор: наличие основных синусов (церебрального, висцерального и вентрального), дорсо-вентральной перегородки в задней части тела и аорты идущей к голове. Поэтому, можно предположить общую схему циркуляции у обеих групп Aculifera, а также высказать гипотезу об исходном (плезиоморфном) состоянии полостей тела акулифер. Изучение морфологического разнообразия циркуляторных систем важно не только для установления родственных отношений между близкими видами класса Aplacophora, но и внесет определенный вклад в понимание возможных путей эволюции Bilateria.

Описание нового вида форонид из Южно-Китайского моря и анализ таксономического разнообразия форонид

Неклюдов Борис Витальевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

borisnekl@yandex.ru

Форониды – тип морских беспозвоночных животных, имеющих всесветное распространение. Во многих акваториях форониды доминируют в бентосных сообществах, определяя их состав, численность может достигать более 100 тысяч особей на квадратный метр субстрата. В настоящее время мировая фауна форонид насчитывает всего 14 видов, однако, их число, по-видимому, гораздо больше, о чем свидетельствуют результаты исследований последних лет. В ходе работы была изучена морфология и микроскопическая анатомия неизвестного вида форонид, собранного в Южно-Китайском море. Форониды образовывали плотное поселение на глубине 2 метра, на скальном грунте, покрытом мягким осадком. Тело заключено в кожистую толстую трубку, образующую несколько слоев. Воротничок в основании щупалец отсутствует, диаметр переднего конца тела достигает 1 мм. Лофофор спиральный с одним оборотом, число щупалец 154, длина 2-3 мм, специализированные половые железы в кроне щупалец отсутствуют. Мускулатура кустистого типа, мышечная формула имеет следующий вид: левый оральный целом – 20 мышечных волокон, правый оральный – 16, левый анальный – 6, правый анальный – 8. Метанефридии с сильно изогнутым выделительным каналом, имеются две воронки: маленькая – анальная и большая – оральная. Имеются 2 гигантских нервных волокна (диаметр 2-5 мкм), проходящие в основании латеральных мезентериев. Сравнительный анализ определительных морфологических признаков показал, что морфология исследуемой форониды наиболее сходна с морфологией *Phoronis hippocrepia*

Wright, 1856, для которого описаны две морфы – обитающие в твердых грунтах или на мягких субстратах. Однако, имеются существенные морфологические различия: принципиально иной тип лофофора; иной тип организации нефридиев; отсутствие у нового вида половых желез в кроне щупалец. Таким образом, форониды из Южно-Китайского моря, вероятно, являются новым видом. Это расширяет представления о фауне форонид Южно-Китайского моря, из которого описано всего 2 вида: *Phoronis australis* Haswell, 1883 и *Phoronopsis malakhovi* Temereva, 2000.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-04-00262 – морфологические исследования; проект № 14-50-00029 – кладистический анализ).

Митохондриальные геномы двух видов *Kinorhyncha* (Ecdysozoa)

Попова Ольга Владимировна

МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики,
Россия, Москва

olga_popova92@inbox.ru

Один из немногих типов животных, для которых пока не опубликовано ни одного полного митохондриального генома – тип *Kinorhyncha* Reinhard, 1881 – изолированный таксон микроскопических червеобразных беспозвоночных. Считается, что киноринхи являются одной из наиболее ранних ветвей Ecdysozoa Aguinaldo et al., 1997, и изучение их митогеномов играет ключевую роль в построении модели эволюции митохондриальных геномов животных.

Образцы двух отдаленных видов киноринх *Echinoderes svetlanae* Adrianov, 1999 и *Ruscophyes kielensis* Zelinka, 1928 были собраны в Кандалакшском заливе Белого моря. Геномные данные были получены методами NGS на секвенаторе Illumina HiSeq2000.

Митохондриальные геномы *E. svetlanae* и *P. kielensis* представляют собой кольцевые молекулы ДНК размером около 15 т.п.н. с низким содержанием GC около 26% для обоих видов. Митогеномы киноринх содержат типичный для животных набор из 37 генов и по одному дополнительному гену метиониновой тРНК. Все гены обоих видов расположены на одной цепи. Дублицированные гены *trnM* обладают сходными размерами и вторичной структурой, а также имеют компенсаторные замены. Белок-кодирующие гены киноринх имеют пять разных стартовых кодонов. Согласно проведенному филогенетическому анализу, киноринхи имеют общую длинную ветвь, отделяющуюся от общего древа Ecdysozoa второй после онихофор. Порядки генов киноринх отличаются друг от друга одной транспозицией и уникальны для Bilateria Hatschek, 1888.

Полные митохондриальные геномы двух видов *Kinorhyncha* обладают сходным нуклеотидным составом и геномной архитектурой. Также они имеют древнюю дубликацию гена тРНК метионина. Ни один из консервативных блоков митохондриальных генов, типичных для митогеномов животных, не сохранился у киноринх. Филогенетический анализ подтвердил базальное положение группы среди Ecdysozoa.

**Биоакустические исследования муравьёв
рода *Formica* (Hymenoptera, Formicidae) и жуков
рода *Scydmaenus* (Coleoptera, Staphylinidae) при их совместном существовании
*Рига Е. Ю.***

*Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Саратов
e.riga@mail.ru*

В настоящее время известно, что муравьи общаются внутри своего сообщества посредством химических и акустических сигналов. Химический канал связи позволяет колонии не пускать враждебные организмы на территорию муравейника. В ходе эволюции другие насекомые, например, гусеницы бабочек рода *Maculinea* (сем. Lycaenidae), научились подражать химическим сигналам муравьёв и сожительствовать с ними. Акустический канал имитировать сложнее, но всё же мирмекофильным жесткокрылым семейства Staphylinidae это удалось.

Целью нашего исследования было установить наличие коммуникационных акустических сигналов между муравьями *Formica rufa* Linnaeus, 1761 и жуками *Scydmaenus helwigii* Herbst, 1792.

Наше исследование включало 2 этапа: полевой и лабораторный. Сбор материала производился летом 2015 года на территории природного парка «Кумысная поляна», в окрестностях города Саратова. В ходе полевых исследований методом ручного сбора в инкубатор были отобраны жуки и муравьи из 20 муравейников разных популяций (1 матка, 4-5 рабочих особей, 4-5 солдата из каждого муравейника), которые после транспортировки были переселены в 8 формикариев с искусственными условиями. Для записи звуков насекомых использовалась система активного шумоподавления авторской сборки из двух микрофонов, двухканального сверхмалошумящего усилителя звука, ноутбука с программным обеспечением для записи и обработки звука.

Были установлены частоты звуковых сигналов (1-4 кГц) муравьёв (разброс от основной частоты для различных каст — 100-300 Гц). При воспроизведении стрекотаний в каждой из колоний достигался эффект обратной связи, т.е. муравьи реагировали на звуки и выполняли определённые команды.

В отношении мирмекофилов было установлено, что жуки могут подражать всем кастам муравьёв (матке, солдатам, рабочим особям) и также заставлять их выполнять различные команды. Таким образом можно сделать вывод о наличии сложных симбиотических взаимоотношениях между муравьями и жуками, где последние являются паразитами второго класса — синойками (по классификации Эриха Васманна, 1910).

**Сравнение видового состава трематод *Myotis dasycneme*
(Chiroptera: Vespertilionidae) из разных мест обитания окончательного хозяина**

Смирнова Анастасия Денисовна

*РГПУ имени А. И. Герцена, факультет биологии, Санкт-Петербург
nastya_209@mail.ru*

Среди паразитов *Myotis dasycneme* Voie, 1825 встречаются представители трех семейств трематод: *Lecithodendriidae* (Lühe, 1901), *Plagiorchiidae* Lühe, 1901 и *Pleurogenidae* Looss, 1899. *M. dasycneme* – широко распространенный вид, трематодофауна которого хорошо изучена в южной части ареала, но недостаточно описана в северной. Северная популяция этих летучих мышей, расположенная на

территории Ленинградской области, считается изолированной. Основной целью работы является описание видового состава трематод *M. dasycneme* из мест зимовок в Ленинградской области.

Сбор летучих мышей, погибших во время зимовки (всего 11 особей), проводили в 2014 и 2015 годах на территории Ленинградской области. Марит, найденных при полном гельминтологическом вскрытии, фиксировали 70% этиловым спиртом. Тотальные препараты изготовлены по стандартной методике, окрашены квасцовым кармином.

В кишечнике *M. dasycneme* обнаружены следующие виды трематод: *Plagiorchis vespertilionis* Lühe, 1899; *P. elegans* Lühe, 1899; *P. koreanus* (Ogata, 1938); *P. muelleri* Tkach et Sharpilo, 1990; *Prosthodendrium ascidia* (Beneden, 1873); *P. chilostomum* (Mehlis, 1831); *P. longiforme* Dollfus, 1931; *Parabascus lepidotus* Looss, 1907; *P. duboisi* Khotenovsky, 1985. Кроме них, найдены 3 вида марит неясного систематического положения.

За исключением *P. muelleri* и *P. elegans*, перечисленные виды известны из *M. dasycneme* в южной части ареала этих летучих мышей. На территории Среднего Поволжья *P. muelleri* описан из *M. brandtii* Eversmann, 1845, *M. mystacinus* Kuhl, 1817, *M. nattereri* Kuhl, 1817 и *Nyctalus noctula* Schreber, 1774, а *P. elegans* из *Plecotus auritus* Linnaeus, 1758. Оба вида трематод ранее не были известны из *M. dasycneme*. Единственный вид из *M. dasycneme*, который отмечен на территории Среднего Поволжья, но не обнаружен в Ленинградской области – *Prosthodendrium hurkovaae* Dubois, 1960. Таким образом, подавляющее большинство видов встречается в северной и южной областях ареала *M. dasycneme*.

Клеточные защитные реакции легочных моллюсков семейства Planorbidae

Токмакова Арина Сергеевна, Усманова Регина Рустамовна

Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена,

Россия, Санкт-Петербург

arina.tokmakova@gmail.com

Понимание механизмов функционирования системы иммунитета лёгочных моллюсков имеет большое практическое значение, обусловленное их ролью промежуточных хозяев в жизненных циклах трематод, многие из которых являются опасными паразитами человека и животных. Ключевым звеном защитных реакций пульмонат признаются циркулирующие клетки гемолимфы – гемоциты. Однако вопросы о гемопоэзе, клеточном составе гемолимфы моллюсков, а также роли гемоцитов в защитных реакциях остаются дискуссионными.

В качестве объектов исследования использовались легочные моллюски: *Planorbarius corneus*, Linnaeus, 1758, *Planorbis planorbis*, Linnaeus, 1758, *Biomphalaria glabrata*, Say, 1818, *Biomphalaria pfeifferi*, Krauss, 1848. Анализ клеток гемолимфы проводили с помощью методов микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Изучение гемопоэтических структур моллюсков, а также гемоцитарных капсул проводилось на гистологических срезах. Для иммунизации моллюсков использовались партениты трематод, ксенотрансплантат, а также инъекции трематодным белком.

В результате проведенного исследования установлено, что универсальным центром гемопоэза для всех изученных планорбид является амёбоцито-продуцирующий орган (АПО). Последний топографически приурочен к перикардiallyму эпителию, однако является самостоятельным органом со сходной для изученных моллюсков структурой.

Именно здесь происходит мультипликация прогемоцитов, которые в дальнейшем дифференцируются в гемоциты и выходят в кровоток.

Среди гемоцитов выделены две основные популяции – гранулоциты и гиалиноциты, различающиеся по морфометрическим характеристикам, количеству гранул в цитоплазме и способности расплываться на субстрате. Также эти клетки проявляют избирательность в отношении фагоцитируемых объектов. Трематодная инвазия улиток приводит к изменению в соотношении гранулоцитов и гиалиноцитов.

Существует два типа клеточных защитных реакций планорбид. Первичная реакция протекает в месте пенетрации чужеродного фактора и представляет собой попытку его изоляции за счет гемоцитов из близлежащих тканей. Вторичная реакция реализуется за счет гемоцитов, сформированных в результате активации АПО (через несколько суток после иммунизации). В результате образуется многослойная капсула вокруг патогена.

Таким образом, полученные результаты подтвердили предположение, что АПО является универсальным органом гемопоэза легочных моллюсков. В нем формируются прогемоциты, дифференцирующиеся в два основных типа циркулирующих клеток – гиалиноциты и гранулоциты. Выявленная фагоцитарная активность гемоцитов обоих типов подтверждает их участие в клеточном ответе моллюсков на чужеродные факторы.

Тонкое строение кишечника некоторых видов свободноживущих нематод Белого моря с разными типами питания

Федяева Мария Александровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

mariaf92@mail.ru

Традиционно тип питания свободноживущих нематод определяется по строению ротовой полости, но этот метод не всегда точен. Мы предположили, что тип питания связан со строением кишечника нематоды. Кишечник нематод представляет собой простую прямую трубку, образованную однослойным эпителием. С внешней стороны клетки подстланы базальной мембраной, а с внутренней они имеют выросты – микровилли, которые могут быть покрыты внеклеточным матриксом (гликокаликсом).

Всего было изучено десять видов беломорских нематод: *Bathylaimus arcticus* Kreis, 1963, *Oxystomina* sp., *Paracanthochus caecus* Micoletzky, 1924, *Halichoanolaimus robustus* (Bastian, 1865), *Desmodora communis* (Bütschli, 1874), *Draconema ophicephalum* (Claparède, 1863), *Paramonhystera filamentosa* (Ditlevsen, 1928), *Sphaerolaimus balticus* Schneider, 1906, *Odontophora deconinki* Galtsova, 1976 и *Sabatieria ornata* (Ditlevsen, 1918). Исследование проводилось ТЕМ и СЕМ методами.

Большинство структур в кишке нематод варьируют от вида к виду, но наиболее разнообразное строение имеют микровилли и гликокаликс. Была найдена связь между структурой микровиллей и гликокаликса и типом питания нематод. Если нематода питается грубыми частицами или она хищничает (т.е. питается другими нематодами или другими крупными объектами), то гликокаликс имеет сложное строение. Если пища тонкодисперсная, то гликокаликс структурно простой (аморфный). Так же имеются промежуточные типы гликокаликса (ламеллярный, аморфный с некоторыми усложнениями), проявляющийся у нематод с различными типами питания. У нематод маленького размера наблюдалась сходство в строении кишки, например, они имеют короткие и толстые микровилли и аморфный гликокаликс.

Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-02597.

**К исследованию разнообразия и таксономии мизид рода
Hemimysis (Crustacea) – обитателей морских пещер полуострова Крым**

Шиян Александра Сергеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

shiyanaalexandra@mail.ru

Мизиды рода *Hemimysis* G.O. Sars, 1869 (Malacostraca: Mysida: Mysidae) широко распространены в северо-восточной части Атлантического океана, в Средиземном, Черном и Каспийском морях. Род включает в себя 11 видов и подвидов, в том числе пещерных, таксономический статус и филогенетические отношения которых нуждаются в критическом пересмотре. В представленной работе рассмотрены отличительные особенности морфологии мизид рода *Hemimysis*, найденных в морских пещерах Черного моря, особенности распределения диагностических признаков, а также анализ филогенетических отношений видов и подвидов этого рода.

Материал был собран в 2003 г. в подводных морских пещерах южного берега Крыма. Ранее подвид *Hemimysis lamornae pontica* Czerniavsky, 1882 в пещерах Черного моря отмечен не был. Исследована морфология черноморской пещерной популяции *H. lamornae pontica*, проведен филогенетический анализ на основе морфологии, включающий в себя собственные и литературный данные по всем известным видам и подвидам рода.

По результатам исследования морфологии дан уточненный диагноз подвида *H. lamornae pontica* с учетом новых данных, описана и проиллюстрирована характерная для данной популяции морфологическая изменчивость. Полученная для всего рода *Hemimysis* филогенетическая реконструкция позволяет пересмотреть таксономический статус подвидов вида *H. lamornae* (Couch, 1856): различия между подвидами оказываются достаточными для того, чтобы перевести их в ранг вида, в том числе изменить статус черноморского подвида на видовой - *Hemimysis pontica* Czerniavsky, 1882. По результатам филогенетического анализа также рассмотрены основные морфологические тренды внутри рода.

**Организация нервной системы спороцист *Plagiorchis* sp. (Trematoda:
Plagiorchiidae) и *Cercaria etgesii* (Trematoda: Lecithodendroidea).**

Щенков Сергей Владимирович, Кремнев Георгий Артурович,

Смирнов Петр Александрович

Санкт-Петербургский государственный университет,

кафедра зоологии беспозвоночных, Санкт-Петербург

sergei.shchenkov@gmail.com

Хорошо изученные нервные системы марит и церкарий трематод послужили богатым источником данных. Организация остальных стадий жизненного цикла – спороцист и редий – известна гораздо хуже. Целью нашего исследования стало изучение серотонин- и FMRF-эргической составляющих нервных систем спороцист *Plagiorchis* sp. и *Cercaria etgesii*.

Материалом для работы послужили спороцисты *Plagiorchis* sp. из моллюсков *Lymnaea stagnalis* L., 1758, собранных в Ленинградской области и партениты *C. etgesii* из

Bythinia tentaculata L., 1758 (заповедник Самарская лука). Материал фиксировали для последующей окраски антителами к серотонину и FMRF-амиду, актину и альфа-тубулину, для приготовления гистологических срезов, окрашенных гематоксилином Гайденгайна. Окрашенных антителами спороцист изучали с помощью микроскопа Leica TCS SP5 MP, гистологические срезы с использованием светооптического микроскопа Leica DM1000. Изображения обработаны в приложениях ImageJ 1.46r (Wayne Rasband) и Amira 5.2.0.

Нервная система спороцист *Plagiorchis* sp. включает в себя биполярные, псевдоуниполярные и мультиполярные нейроны (около 12 клеток). Они формируют плексус, в котором проявляется билатеральная симметрия. Часть нейронов залегает непосредственно под пластинкой тегумента. Некоторые нервные клетки лежат под слоем цитонов тегумента, и несколько – гораздо глубже. Создается ложное впечатление, что они находятся прямо между развивающимися эмбрионами. Но они расположены среди многочисленных отростков эндоцисты, пронизывающих и разделяющих всю зародышевую полость.

В нервной системе спороцист *C. etgesii* удалось визуализировать 1 5НТ-эргический нейрон, залегающий рядом с родильной порой. Между отростками эндоцисты нейронов не обнаружено.

Полученные данные по строению нервных систем и организации зародышевой полости спороцист *Plagiorchis* sp. и *C. etgesii* в очередной раз опровергают господствовавшие долгое время представления о сильно упрощенном устройстве партенит.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

ЗООЛОГИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ

Средообразующая деятельность серой цапли Сумкинской колонии (Татарстан)

Антонова Оксана Анатольевна

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань
oksanchikantonova@mail.ru*

Сумкинская колония серой цапли *Ardea cinerea* существует более 50 лет, относится к памятникам природы Татарстана. Известно, что колониальные животные, преобразуя среду своего обитания, не могут долго жить на одном и том же месте. Воздействие цапель выражается в экскреторной деятельности и механическом воздействии на растения. Экскреторная деятельность птиц приводит к загрязнению побегов растений, гибели листвы, накоплению биогенных элементов в почве. Птицы строят на вершинах деревьев крупные гнезда, под тяжестью которых обламываются ветки. В 1990 году Сумкинская колония, сократив численность, переместилась на новое место.

В настоящее время цапли гнездятся на берегу р. Сумки в смешанном лесу с преобладанием липы. Птицы устраивают гнёзда исключительно на спелых соснах на высоте 25–35 м. В 2007 г. в колонии насчитывали 386 гнезд (Миронов, Гаранин, 2007), в 2015 г. – 199 гнезд, из них 82 жилых. За четверть века под воздействием жизнедеятельности серой цапли произошло изменение фитоценоза. Если в 2007 г. в колонии найдены 20 видов травянистых растений, то в 2015 г. число видов сократилось в два раза. Индекс видового богатства Менхиника изменился с 0,97 до 0,68 соответственно. Видовое богатство заметно сокращается в течение одного вегетационного периода. В радиусе двух метров от деревьев, на которых устроены гнёзда, травянистая растительность не встречается.

Экскреторная деятельность цапель сказывается и на почвенной фауне. Дождевые черви под колонией не встречаются, однако видовой состав почвенных клещей одинаков и под колонией, и на контрольном участке, хотя общее количество особей выше под колонией. Количество особей и видовой состав ногохвосток в почве под колонией ниже, чем на других участках леса.

Колония цапель привлекает и позвоночных животных. Оброненную добычу (рыбу, земноводных) подбирают бродячие собаки. Упавших птенцов они не трогают. Яйцами и птенцами кормятся ворон *Corvus corax* и сизая чайка *Larus canus*. Ворон отбирает добычу в момент передачи её птенцам.

Таким образом, определяя устойчивые биоценотические связи, серая цапля является значимым средообразователем.

Спутниковое мечение атлантического моржа на острове Вайгач в 2015 году *Болтунов Никита Андреевич*

*Институт биологии и химии МПГУ, Москва
MetalDude@yandex.ru*

С 31 июля по 6 августа 2015 г., на мысе Лямчин Нос о. Вайгач научно-исследовательская группа Совета по морским млекопитающим проводила спутниковое мечение взрослых самцов атлантического моржа (*Odobenus rosmarus rosmarus*).

В процессе работ было установлено 9 спутниковых меток системы Argos. Принцип крепления к животному – гарпунный наконечник, который фиксируется в покровах животного. Для того чтобы пометить моржа таким передатчиком использовали длинное древко (2–2,5 м). Из 7 установленных и приведенных в действие передатчиков, один проработал всего сутки. Максимальный срок работы одного из установленных передатчиков составил 83 дня. В общей сложности от всех установленных передатчиков получили 5889 определений местоположения помеченных животных. На основании полученных данных можно выделить два основных района активности исследованных моржей: о. Вайгач – острова Ненецкого заповедника и от о. Вайгач к территории у островов Шараповы кошки. Примечательно, что подавляющее большинство помеченных животных также заходили на лежбище острова Матвеева и проводили много времени в акватории между двумя лежбищами. Возможно, там находится основное место кормления этой группировки атлантических моржей.

Помимо мечения были собраны образцы биопсии кожи для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Личинки светящегося анчоуса *Lampanyctus intricarius* (Mycetophidae) из юго-западной части Тихого океана

Большакова Яна Юрьевна

*Института Океанологии имени П.П. Ширшова РАН,
лаборатория океанической ихтиофауны, Москва
yanusrunaa@mail.ru*

Род *Lampanyctus* принадлежит к семейству Mycetophidae и включает, по последним оценкам, 25–26 видов, широко распространённых в умеренных и тропических водах Мирового океана.

Материалы по личиночному развитию миктофид рода *Lampanyctus* довольно скудны, ранние стадии их развития описаны только для девяти видов: *Lampanyctus crocodilus*, *L. pusillus*, *L. alatus*, *L. australis*, *L. lepydolychnus*, *L. nobilis*, *L. jordani*, *L. tenuiformis* и *Lampanyctus* sp., предварительно отнесённые к *L. photonotus*. Правильность идентификации личинок ещё двух видов – *L. festivus* и *L. turneri* – вызывала сомнения у авторов их описаний.

В сборах 34-го рейса НИС «Дмитрий Менделеев» в юго-западную часть Тихого океана, среди личинок рода *Lampanyctus* обнаружены экземпляры, отнесённые нами к ранее неизвестным личинкам *L. intricarius*. Дополнительно изучены две личинки из юго-восточной Пацифики, также отнесённые к *L. intricarius*. Ещё три личинки из юго-восточной Атлантики были предварительно идентифицированы с *L. intricarius* и отнесены нами к группе *L. intricarius* / *lepydolychnus*.

Личинки из всех трёх районов – юго-западной и юго-восточной Пацифики и юго-восточной Атлантики – очень близки по меристическим признакам, характеру пигментации и пропорциям тела. Морфологически они сходны с личинками *Lampanyctus*, описанными ранее как *L. isaacsi* (= *Nannobrachium isaacsi*), *L. lepydolychnus* и *L. cf. photonotus*. Известно, что *L. lepydolychnus* тяготеет к прибрежным водам и не отмечен в юго-западной части Тихого океана восточнее 165° з.д., где были пойманы все личинки, отнесённые нами к *L. intricarius*. Взрослые экземпляры только четырёх видов лампаниктов (*L. intricarius*, *L. macdonaldi*, *L. australis* и *L. pusillus*) были пойманы в ходе сборов НИС

«Дмитрий Менделеев» в юго-западной части Тихого океана. Причём личинки двух из них (*L. australis* и *L. pusillus*), известные на ранних стадиях развития, морфологически значительно отличаются от имеющихся в нашем распоряжении личинок *L. intricarius*. *L. macdonaldi* можно исключить из рассмотрения из-за значительной разницы в числе позвонков и числе жаберных тычинок.

Учитывая все вышесказанное, мы относим описанных нами личинок из юго-западной и юго-восточной Пацифики к *L. intricarius*.

Морфобиомеханическая характеристика крестцово-подвздошного сустава у некоторых млекопитающих

Варакса Павел Олегович

*МГАВМиБ имени К.И. Скрябина, кафедра анатомии и гистологии животных
имени проф. А.Ф. Климова, Россия, Москва*

fantazer2006@yandex.ru

Анализ структурно-функционального состояния крестцово-подвздошного сустава показывает, что крестцовая кость внедряется между двумя подвздошными костями напоподобие клина, благодаря чему туловище своей тяжестью не может его сместить вперед и вниз, до тех пор, пока стойки тазового свода не будут разъединены. Согласно Ф. Я. Дзержинскому (2005), «подвздошная кость наклонена вперед, ибо нет мышц, угрожающих «сорвать» таз назад, зато есть такие, что тянут его вперед (туда же направлена и сила толчка). При существующем наклоне подвздошная кость вместе с крестцовой костью как бы продолжает назад поясничный отдел позвоночника, вертикальное изгибание которого очень важно для локомоции». В основу нашей работы положен анализ результатов комплексных исследований, выполненных на 90 животных в возрасте от 5 месяцев до 3 лет, принадлежащих к 6 семействам: Canidae (собаки различных пород, волк), n = 15; Felidae (кошка домашняя, рысь), n = 15; Mustelidae (норка, соболь), n = 15; Bovidae (овца), n = 15.

Внутрисуставная связка, впервые обнаруженная нами у кошачьих, служит центром вращения, а ушковидная поверхность, располагаясь по радиусу вращения, ограничивает амплитуду движения в суставе. При гистологическом исследовании крестцово-подвздошного сустава (сочленения) у куньих в каудальной части крыла подвздошной кости отмечается наличие участка гиалинового хряща с дополнительным слоем фиброзного (волоконистого) хряща. Мы думаем, что это связано с механизмом дополнительной стабилизации сустава вследствие особенностей движения крестца по отношению к крыльям подвздошной кости в биомеханике бега у данных животных. Есть основание полагать, что совершенствование у животных опорно-двигательного аппарата в процессе приспособления к выносливому бегу, при котором отталкивание тазовыми конечностями происходит последовательно (собачьи, копытные), снижает подвижность сустава, что обусловлено необходимостью уменьшения движений таза в сегментарной плоскости. Это находит подтверждение в структурной организации таза и его соединений в таксономическом ряду. У кошачьих и куньих отмечается постоянство формы ушковидной поверхности, в то время как у собачьих она вариабельна, а у мелкого рогатого скота характеризуется шероховатым рельефом.

Вкусовая привлекательность некоторых водных растений и животных для нильской тилапии *Oreochromis niloticus*

Виноградская Мария Ильинична

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
marefa@mail.ru

Для многих рыб известна вкусовая привлекательность классических вкусовых веществ, аминокислот и органических кислот. Отношение рыб к вкусу сложных натуральных комплексов химических веществ, в том числе различных экстрактов водных животных и растений, остаётся практически неизученным. Мы определяли вкусовую привлекательность водных экстрактов растений и животных для нильской тилапии. Рыб (12 особей, TL = 70–75 мм) содержали в отдельных аквариумах (5л) при естественном режиме освещения и $t_{\text{воды}} = 24\text{--}25^\circ\text{C}$ (терморегуляторы AquaEL EH-25W); кормили живыми личинками Chironomidae один раз в день после экспериментов.

В 1737 опытах регистрировали ответы рыб на агар-агаровые гранулы (2%), содержащие краситель Ponceau 4R (5 μM) и водный экстракт (175г/л) одного из 20 видов растений и животных. В контроле использовали гранулы, содержащие только краситель. Регистрировали потребление гранул, число схватываний, длительность латентного периода (от момента подачи до схватывания рыбой гранулы), продолжительность удержания гранулы после первого схватывания и суммарно за все время опыта.

Стимулирующим потребление гранул действием обладали экстракты личинок Chironomidae, ракообразных *Pandalus borealis*, *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Chaoborus* sp. и *Hemidiaptomus* sp., растений *Riccia fluitans*, *Lemna minor*, *Lactuca sativa* (сорт «Афицион»), листьев и корней *Eichhornia crassipes*. Экстракты шести видов амфибий, морской звезды *Fromia milleporella*, двух видов голотурий, элодеи *Elodea canadensis* обладали детергентным действием. Экстракты кожи *Xenopus laevis*, кожи и мышц пескоройки *Lametra fluviatilis* не оказывали влияния на потребление рыбами гранул. Гранулы с отталкивающими по вкусу экстрактами рыбы достоверно чаще подвергали повторному тестированию, при этом продолжительность первого и суммарного удержания гранулы рыбой в ротовой полости была значимо меньше, чем для контрольных гранул. Чем хуже потреблялись гранулы, тем короче были отдельные удержания.

Мы показали, что различные водные организмы, которыми рыбы могут питаться в природных водоемах, существенно отличаются по вкусовым свойствам. Разная вкусовая привлекательность потенциальных объектов питания может служить механизмом, обеспечивающим селективность питания рыб. Отталкивающие вкусовые свойства некоторых из исследованных гидробионтов указывают на использование ими химической защиты от рыб с помощью природных детергентов.

Структурные особенности криков благородного оленя – марала во время гона

Голосова Ольга Станиславовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва
golosova95@yandex.ru

Структура гонных криков самцов благородного оленя (*Cervus elaphus*) сильно различается между подвидами. Мы описали структурную изменчивость криков самцов марала (*C. e. sibiricus*) в трех группировках: природной (Хакасия), полувольтной (Тверь) и фермерской (Кострома). Для сбора данных использовали автоматические

звукозаписывающие устройства, что позволило охватить весь гонный период. Мы провели спектрографический анализ 435 звуков (145 для каждой группировки). Большинство гонных криков (81,6%) были одиночными, остальные (18,4%) состояли из длинного главного крика и нескольких коротких. Все крики оказались высокочастотными (максимальная основная частота от 0,52 до 2,56 кГц, в среднем 1.36 ± 0.29 кГц) и имели хорошо выраженное плато контура основной частоты. По форме контура основной частоты крики разделены нами на трапецевидные (74,3%), нисходящие (23,7%) и седлообразные (2,1%). Большая часть криков (76,1%) содержала вторую низкую основную частоту (от 80 до 720 Гц), фрагменты детерминированного хаоса встречались в 20,3% криков. Сравнение акустических параметров гонных криков показало, что длительность всего крика и длительность плато были достоверно короче ($F_{2,432}=10,1$, $p<0,001$; $F_{2,432}=17,2$, $p<0,001$ соответственно), а значения максимальной основной частоты выше ($F_{2,432}=12,2$, $p<0,001$) в Костроме по сравнению с Хакассией и Тверью. Возможно, это было связано с содержанием на ферме в условиях высокой плотности и лучшей доступности корма. Различия в структуре гонных криков между тремя группировками марала были существенно меньше, чем различия между криками марала и других восточных подвидов благородного оленя – вапити (*C. e. canadensis*) и изюбря (*C. e. xanthopygus*). Таким образом, основная частота гонных криков самцов может служить надежным диагностическим признаком для восточных подвидов благородного оленя.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-06241.

Оценка гаплотипического разнообразия снежных баранов Якутии на основе гена цитохрома *b*

Грицышин Владимир Андреевич

Всероссийский институт животноводства имени Л.К. Эрнста,

Московская обл., Дубровицы

vladimir.sokol.gritsyshin@gmail.com

Снежные бараны подрода *Pachyceros* населяют горные местообитания в таёжных и арктических природных зонах Азии и Северной Америки. До настоящего времени анализ эволюционной истории, внутривидовая структура и разнообразие остаются малоизученными для всех видов этой группы, в том числе собственно снежного барана *Ovis nivicola*, эндемика России. Данное исследование призвано провести предварительную оценку генетического разнообразия снежных баранов Якутии.

Пробы ткани снежного барана собраны на всем протяжении Верхоянского хребта, на хребте Черского и Момском районе. Из проб выделяли ДНК стандартными методами, полная последовательность гена цитохрома *b* получена амплификацией с праймерами L14724(5'-CGAGATCTGAAAACCATCGTT-3'), CYTB_IN-R(5'-CCTGTTTCGTGGAGGAAGAG-3'), CYTB_IN-F(5'-TACCCTCACCCGATTCTTCG-3'), H15915(5'-GGAATTCATCTCTCCGGTTTACAAGAC-3'). Подобран праймер Ov_IN-FA(5'-TACCCTCACCCGATTCTTCG-3'). Секвенирование осуществляли с теми же праймерами. Выравнивание, расчет попарных дистанций (N. of diff.) и филогенетический анализ проводили в программе MEGA 6.0. Последовательности проверяли на отсутствие псевдогенов визуально и филогенетическим анализом методом ближайшего соседа. В анализе использовали последовательности из GenBank AJ867262.1, AJ867263.1, AJ867264.1.

Мы проанализировали полные последовательности гена *cytb* 46 особей снежного барана. Всего выявили 27 гаплотипов. Из них два были представлены единичными последовательностями из GenBank, представляющими Магаданскую область, один был встречен и в Магаданской области (GenBank) и в Якутии, и 24 описаны нами впервые. Два гаплотипа были представлены 8 и 7 особями, к шести гаплотипам относились по 2 особи, и 16 гаплотипов представлены единичными особями. На филогенетическом дереве гаплотипы из Магаданской области располагаются совместно со снежными баранами из Якутии.

Якутская популяция снежного барана характеризуется высоким гаплотипическим разнообразием, со значительной долей отдельных гаплотипов, что может свидетельствовать о прохождении бутылочного горлышка в недалёком прошлом. Наши данные согласуются с высказывавшимся ранее предположением о единстве баранов Якутии и Охотского побережья.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, проект №14-36-00039.

Использование укрытий при возврате на индивидуальный участок травяной лягушки

Грицышина Екатерина Евгеньевна, Шлычков Артемий Александрович, Глебова Мария Николаевна, Горшкова Анна Алексеевна, Капуста Анастасия Александровна, Колачевский Николай Николаевич, Медведева Елизавета Игоревна, Пипия София Онисеевна, Потапова Анна Захаровна, Романская Мария Сергеевна, Табачник Алексей Константинович, Черных Михаил Александрович, Шлык Валерия Ивановна
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
cat2809@yandex.ru

Травяная лягушка (*Rana temporaria* L.) является традиционным зоологическим объектом, но особенности её ориентационного поведения исследованы мало. Мы исследовали характер использования пространства лягушкой, в частности укрытий, при возврате на индивидуальный участок после искусственного перемещения на различное расстояние от него.

Исследования проводили на Звенигородской биологической станции МГУ им. С.Н. Скадовского летом 2013 и 2015 гг. Взрослых особей травяной лягушки отлавливали, измеряли длину тела и вес, после чего при помощи пояска закрепляли отслеживающее устройство, состоящее из катушки с ниткой (его вес не превышал 5% от веса лягушки). Лягушек выпускали на расстоянии от 0 м до 300 м от места поимки; в месте выпуска конец нити закрепляли за колышек, в результате чего маршрут маркировался размотанной нитью; проверяли два раза в сутки, пройденный лягушками маршрут картировали, отмечая встречаемые ими на пути укрытия, преграды и пр.

Обнаружено, что лягушки, выпущенные на расстоянии до 300 м включительно, ориентировались к месту поимки. По картам маршрутов измерили перемещения лягушек вдоль, под и над бревнами, через завалы веток и по открытым участкам леса, вычислили долю каждой категории во всей длине маршрута. Обнаружено, что в зависимости от того, на каком расстоянии от места поимки выпускали лягушек, изменялась доля маршрута, которую они проходили по открытому пространству ($p=0,01$ по критерию Краскела-Уоллиса).

Наиболее скрытно перемещались лягушки, выпущенные в месте поимки, а наименее – выпущенные в 40 и 100 м от него. При этом лягушки, выпущенные на своём участке, использовали в качестве укрытий брёвна, а выпущенные вдали от места поимки – хорошо видимые издали завалы веток и деревьев. Такие различия, возможно, связаны с тем, что перемещенные на меньшее расстояние лягушки стремятся скорее вернуться на свой участок, поскольку чувствуют его близость, и потому пренебрегают опасностью быть съеденными. В то же время лягушки, перемещенные на большее расстояние, действуют более осмотрительно и вынуждены пользоваться убежищами для восполнения сил и укрытия от хищников.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а 14-04-32243.

Сравнение функциональной морфологии висцерального аппарата лососевых и аравановых рыб

Громова Е.С.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
zhenya_s@inbox.ru*

Анализ характера взаимосвязи между формой и функцией является актуальной темой морфологических исследований. Изучение строения аппарата питания рыб позволяет выявить особенности трофических адаптаций висцерального аппарата у некоторых примитивных Teleostei. Нами описаны новые черты сходства в строении мускулов висцерального аппарата Salmonidae и Osteoglossidae (на примере семги (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) и серебряной араваны (*Osteoglossum bicirrhosum* Cuvier, 1829)), которые дают основу для подтверждения ранее обнаруженных признаков подобия в способах внутриротовой обработки добычи этих двух примитивных групп рыб.

Изучение макроскопического строения мускулов и соединительнотканых элементов аппарата питания семги и серебряной араваны проводили на свежих и спиртовых препаратах, изготовленных по традиционной методике. На основе цифровых цветных фотографий препаратов выполнили более 50 точных контурных рисунков изучаемых объектов.

Выполнено детальное исследование строения некоторых мускулов и соединительнотканых образований аппарата питания семги и серебряной араваны для анализа их совместного функционирования в ходе разных фаз обработки пищи внутри ротовой полости, описанных для рыб данных семейств. Установлено, что мускулы, обычно хорошо обособленные у Neoteleostei, у семги и серебряной араваны вступают между собой во взаимодействие при помощи соединительнотканых элементов, образуя «порции» единых «комплексных мускулов», которые получают новые функциональные возможности, не доступные их отдельным составляющим. Используя различные комбинации областей совместно сокращающихся компонентов такого многопорционного мускула, рыбы могут добиться разных особенностей движений суспензориумов и нижней челюсти, обеспечивая оптимальное приложение сил к удерживаемому в челюстях объекту. Так, *m. adductor mandibulae* и *m. levator arcus palatini* у семги и серебряной араваны контактируют между собой при помощи сходным образом устроенной подвешивающей перепонки суспензориума, по сути, совместно образуя «двухпорционный мускул». Благодаря этому возрастает эффективность сокращения аддуктора в процессе схватывания добычи и её последующей внутриротовой обработки.

Автор выражает признательность научному руководителю доц., к.б.н. Валерию Васильевичу Махотину.

Социальные взаимодействия детёнышей нильских крыланов

Дудорова Анастасия Валерьевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

fredragon11@yandex.ru

Развитие социального поведения в онтогенезе особенно интересно изучать у тех видов, где контакты детенышей не ограничиваются близкими родственниками, а включают взаимодействия со сложно устроенным социумом. Нильские крыланы *Rousettus aegyptiacus* – колониальный и социальный вид, но изучать их в природе сложно (обитают в пещерах, ведут ночной образ жизни). В колониях крыланов Московского зоопарка нам удалось проследить процесс вхождения детенышей в социум.

Наблюдения вели в период с октября 2014 по сентябрь 2015 в трёх группах крыланов (22 особи). Методом сплошного протоколирования и мгновенных выборок собрано 145 часов визуальных наблюдений и снято 720 часов видеосъемки.

Первые две недели жизни детеныш контактирует только с матерью, постоянно находится на ней, удерживаясь на соске. На 3-4 неделе мать начинает оставлять детеныша одного, отсутствуя около 10% времени. Месячный детеныш, оставшись один, увеличивает подвижность и начинает вступать в контакты с другими членами колонии.

При встрече детеныша с чужой самкой, после обнюхивания, самка отворачивается или бьёт сложенными крыльями перед детенышем, и тот немедленно отходит. Подростки проявляют интерес к детенышам, обнюхивают их, преследуют, обнимают крыльями. Мы впервые описали игры между детенышами и подростками. Их инициатором всегда выступает подросток. Одновозрастные детеныши взаимодействуют, обнюхивая друг друга, затем могут оставаться рядом. Взрослые самцы не проявляют агрессии к молодым крыланам, обнюхивают их, отмечены случаи груминга. Наши данные показали, что детеныши остаются с взрослыми самцами более 50% времени отсутствия матери. Обнаружены достоверные различия во времени, которое детеныши проводят в контакте с разными самцами. В возрасте 100–120 дней детеныши самостоятельно питаются и хорошо летают. В это время поведение взрослых самцов меняется, они начинают агрессивно реагировать на детенышей-самцов. Формируются подростковые группы.

Таким образом, наши исследования выявили сложную сеть социальных взаимоотношений внутри колонии, в которую, одновременно с освоением окружающего пространства, вовлекается детеныш.

Новые данные о репродуктивной биологии рыбы-лягушки

Захарченко Дарья Андреевна¹, Мазникова Ольга Александровна²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и

океанографии – ВНИРО, Москва

defida@inbox.ru olyatinro@yandex.ru

Рыба-лягушка *Aptocyclus ventricosus* (Pallas, 1769) является слабоизученным эндемиком северной части Тихого океана. Она занимает важное место в трофических цепях, так как является пищей для некоторых морских млекопитающих. Известно, что

размножение этой рыбы идёт в прибрежной зоне, и многие исследователи считают, что после нереста самки умирают, а самцы остаются охранять кладку. Целью настоящей работы является исследование гонад самок с использованием гистологических методов.

Материал был собран в северной части Охотского моря весной 2014 года на научно-исследовательском судне «Профессор Кагановский». Гонады 41 самки были зафиксированы в 4%-м растворе формальдегида, гистологическая обработка проводилась по стандартной методике: ксилольно-спиртовая проводка с последующей заливкой в парафин. Препараты срезов толщиной 5 μm последовательно окрашивались гематоксилином по Эрлиху и эозином.

У исследованных самок встречались гонады разных стадий зрелости. Самая ранняя из отмеченных стадий зрелости – II, половые продукты еще не начали развиваться, присутствовали оогонии и ооциты периода превителлогенеза. Видоспецифической особенностью ооцитов периода превителлогенеза у рыбы-лягушки являлось наличие вакуолей в периферических областях цитоплазмы. III стадия зрелости яичников характеризовалась началом созревания гонад, старшую генерацию половых клеток представляли ооциты периода вакуолизации. В яичниках преднерестовых самок (IV стадия зрелости) отмечали заполненные желтком ооциты, у нерестовых особей (V стадия зрелости) – гидратированные. В гонадах как созревающих, так и зрелых самок присутствовали ооциты периода превителлогенеза, которые составляли резервный фонд. В ходе исследования были встречены отнерестившиеся самки. В их гонадах присутствовали опустевшие фолликулы, превителлогенные ооциты и ооциты периода вакуолизации.

В ходе исследований было показано, что рыба-лягушка является полициклическим видом, не все самки погибают после нереста. Для неё характерен прерывистый тип оогенеза и синхронное развитие ооцитов в период вителлогенеза.

Полученные результаты расширяют существующие представления о репродуктивной биологии рыбы-лягушки и подтверждают необходимость её дальнейшего изучения.

Сравнительная филогеография кротов из родов *Talpa* и *Mogera*

Землемерова Елена Дмитриевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

ИПЭЭ имени А.Н. Северцова, Россия, Москва

zemlemerovalena@ya.ru

Филогеографическая структура ряда видов из родов *Talpa* и *Mogera* проанализирована нами в экологическом и таксономическом аспектах.

Филогенетический анализ проведен по последовательностям митохондриального гена *cytb* с помощью трех различных алгоритмов. В филогеографическом анализе рассчитаны показатели генетического разнообразия, построена медианная сеть, проведены тесты на нейтральность и на сигнал экспансии.

У *T. europaea* найдены две основные группы гаплотипов: 1) гаплотипы с Апеннинского п-ва и 2) гаплотипы из всех остальных регионов Европы. Внутри первой гаплогруппы выделяются два дополнительных кластера: образцы из центральной и северной Италии. Полученные результаты показывают, что средиземноморские рефугиумы данного вида, скорее всего, находились в северной Италии, на Балканах, на

северном и восточном побережье Черного моря и на юге Франции. В составе *T. altaica* выделяются три внутривидовые группировки, соответствующие трём географическим локалитетам (Новосибирск, оз. Телецкое и ст. Мирное), однако уровень их дивергенции невысок. Вероятно, относительно слабая филогеографическая структура *T. europaea* и *T. altaica* объясняется преимущественно равнинным распространением обоих видов и отсутствием по этой причине существенных преград для генного потока. Отсутствие выраженной филогеографической структуры отмечено и для *M. robusta*, которая, как и обыкновенный крот, имеет относительно большой равнинный ареал.

Другие виды *Talpa* и *Mogera* обнаруживают более сильную филогеографическую структуру, несмотря на меньшие ареалы: *T. caeca* включает апеннинскую и балканскую филогруппы; *T. romana* – филогруппы из центральной и южной Италии; *T. occidentalis* – группировку из Португалии и юго-восточной Испании. В роде *Mogera*: *M. kanoana* включает три филогруппы (г. Алишан, Софон, Кентинский нацпарк), *M. wogura* – три островные группировки Кинки-Токаи, Кюсю, Чугоку-Сикоку.

Результаты нашего исследования показали, что интересной особенностью кротов является их глубокая внутривидовая генетическая подразделенность, связанная, вероятнее всего, с рядом лимитирующих факторов, которые ограничивают свободное перемещение кротов и определяют их парапатрическое или аллопатрическое распространение. К ним относятся сухость и мерзлота почв, наличие водных преград, высокогорья, а также, вероятно, жесткая территориальность.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а 16-34-00635.

**Пространственная дифференциация песни зяблика в условиях
Московского мегаполиса
Кисляков Илья Викторович**

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
ilyakislyakov@ya.ru*

Для зяблика *Fringilla coelebs* характерна раздельная манера пения и типологическая организация песни. Элементы песни (слоги) константны по форме, одинаковые слоги следуют друг за другом, организуя так называемые фразы, причём различаются стереотипные типы песен. Для территориального комплекса типов песни употребляется понятие «вокального диалекта». С учётом высокой степени филпатрии и гнездового консерватизма зяблика представляет интерес изучение дифференциации его популяционного репертуара в условиях фрагментированных местообитаний – системы городских парков.

На 19 парковых территориях г. Москвы (22 точки) в 2014–2015 гг. произвели запись вокализаций. Для каждого самца мы стремились записать по меньшей мере два идентифицируемых типа песни, такие записи получены для 444 самцов. Проанализированы вокальные сессии всех самцов, составлен каталог типов песен и слогов.

Преимущественно в пределах МКАД выявлено 42 типа песни, 70 типов составляющих их слогов. Хорошо выделяются широко распространенные типы песен, общие для всех территорий, небольшая промежуточная группа, а также песни редкие, в том числе уникальные (исполнялись одним самцом). Популярность элементов (слогов) также неравномерна. Используя метод многомерного непараметрического шкалирования,

получена графическая модель, позволяющая анализировать взаимное размещение группировок самцов в зависимости от степени сходства групповых репертуаров. Это размещение совпадает с пространственным распределением точек записи не полностью. Проводились измерения длины, частотного диапазона песни и длительности отдельных слогов для типов песен с кардинально разной частотой встречаемости, а также (для всех типов) определено количество фраз основной части и неповторяющихся слогов предросчерка-росчерка.

Количественные параметры, по-видимому, не связаны с распространенностью типов песен. При сравнении частот реализованных попарных сочетаний типов песен в индивидуальных репертуарах и рассчитанных ожидаемых частот обнаруживается частичная кластеризация Московской популяции. Итак, на основании пространственного распределения типов песен и элементов в популяции можно сделать вывод о противоборстве тенденций к гнездовому консерватизму и дисперсии молодых особей в московской популяции.

Наши исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект 16-04-01721).

Соотношение типов активности лисят в дикой природе на основании данных фотоловушек

Коренькова Анна Александровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

korenkova@mail.ru

Для полноценного понимания поведения взрослой особи необходимо изучение процессов формирования поведения животного в естественной среде обитания. Цель работы – изучение развития поведения у лисят *Vulpes vulpes* от выхода из норы до начала расселения.

В июне-августе 2013–2015 гг. в Кроноцком заповеднике (Камчатский край, Россия) был собран материал по 11 лисятам в возрасте от 3 до 13 недель из трёх выводков посредством фотоловушек, установленных на норах. Мы составили базу данных, где регистрировали форму поведения животных, социальную направленность действий, наличие взаимодействий и возраст щенков.

Мы подсчитали изменение соотношения форм поведения лисят на норе в зависимости от возраста, что взаимосвязано с когнитивным и физиологическим развитием щенков. С возраста четырёх недель происходит интенсификация социальных контактов щенков, которая начинает спадать в возрасте десяти недель. Агрессивные взаимодействия между щенками единичны вне зависимости от возраста (для всех выводков).

Первое ношение щенком пищи в зубах отмечено на третьей неделе. Питание молоком прекращается в возрасте семи недель. Автогруминг регулярно отмечается, начиная с четырёх недель. В возрасте шести-восьми недель отмечена интенсивная манипуляторная активность в основном проявляющаяся в копании субстрата. В девяносто недель исчезает реакция следования за матерью.

Основным несоциальным типом поведения возле норы является исследовательское (около 45%), оно включает обнюхивание, наблюдение, осмотр местности.

Количество активности лисят на норе снижается с взрослением. Становясь старше, лисята всё чаще отдыхают возле отнорков; происходит изменение структуры их суточной

активности: доля дневной активности относительно всей активности лисят снижается (с 63% в 4 недели до 44% в 13 недель).

Изменения активности лисят на норе с возрастом связано с возрастающей интенсивностью освоения пространства и с увеличением самостоятельности лисят по мере приближения периода расселения (от 13–15 недель).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, грант №13-04-0019, и Кроноцкого заповедника под руководством А.А. Ячменниковой (ИПЭЭ РАН).

Развитие терморегуляции у птенцов японского перепела

Лемазина Алёна Алексеевна,

Марченко Александра Александровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

searlekino@mail.ru, ptyhozoon@gmail.com

В работе исследовали становление терморегуляции у птенцов японского перепела (*Coturnix japonica*). Задачей ставили определение момента установления эффективной терморегуляции, поскольку к нему приурочен детский критический период импринтинга. Известно, что у птенцовых эффективная терморегуляция устанавливается в середине гнездового периода, у выводковых утиных (*Anatidae*) – в первые сутки после вылупления. При этом у выводковых курообразных (*Galliformes*) способность к развитию терморегуляции выражена слабее, чем у уток. Птенцов с момента вылупления до девятого дня содержали в садке, обогреваемом лампой накаливания. Для определения момента установления эффективной терморегуляции птенцов помещали в термостабильную камеру при температуре 18–19°C (нижняя граница термонеutralной зоны взрослых) примерно на 20 минут. Перед началом и во время эксперимента с интервалом 1–4 мин у птенцов измеряли температуру тела (T_B) с помощью термометра Multimeter 16 Fluke. Когда T_B птенца приближалась к 30 °C, птенцов возвращали в садок. Птенцы были разделены на две группы: четырёх птенцов помещали в холодную камеру ежедневно, трёх – только на 4-ые и 9-ые сутки. T_B птенца понижалась при помещении в температуру 18°C до 5–6 дня. У однодневных птенцов температура снижалась практически линейно со скоростью около 0,42°C/мин (от 39 до 31,6 °C). В течение последующих трёх суток T_B птенцов к 20-ой минуте пребывания в камере опускалась в среднем до 32°C. На пятые сутки произошел скачок в уровне поддерживаемой температуры, она составляла 36,4°C. В течение 6–9 суток у птенцов при нахождении в холодной камере температура не понижалась и держалась около 40 °C. С 7-ых суток птенцы при помещении в камеру могли повысить T_B с 39,3 до 39,6°C. Таким образом, нам удалось показать, что эффективная терморегуляция (способность поддерживать T_B выше 37°C при температуре среды, соответствующей термонеutralной зоне взрослых) у выводковых птенцов японского перепела устанавливается на 6-ые сутки. Старшие птенцы способны увеличивать T_B при понижении температуры среды. Показано также, что каждодневное краткосрочное охлаждение способствует выработке способности более эффективно поддерживать T_B .

**Надостистая связка в кинематике позвоночного столба
некоторых млекопитающих**

Лукошюс Елизавета Валерьевна

МГАВМиБ имени К.И.Скрябина, Россия, Москва

31071996@list.ru

Исследовали роль надостистой связки в кинематике позвоночного столба животных на материале домашней кошки, домашней собаки, обыкновенной лисы и обыкновенной рыси и на препарате позвоночника собаки с моделью абсолютно жёсткой надостистой связки в краниальной части поясничного отдела позвоночника.

У всех исследованных животных в области грудного и поясничного отделов контрлатеральные грудопоясничные фасции, собственные фасции длинейших мышц, межкостистые связки и сухожилия остистых и многораздельных мышц сливаются вдоль медиальной линии позвоночника и образуют общий фасциальный тяж, соединяющий свободные концы остистых отростков. Утолщение тяжа, приводящее к образованию надостистой связки, происходит вследствие продолжения роста соединённых краёв указанных фасций в вентральном направлении. Таким образом, надостистая связка не является обособленной, самостоятельной структурой.

Степень развития надостистой связки у собачьих заметно выше, чем у кошачьих. Экстензионные характеристики позвоночника собаки и кошки близки, но по способности к флексии позвоночник кошки имеет значительное превосходство. Тот факт, что у кошки, в отличие от собаки, межпозвоночные диски удлиняются при экстензии позвоночника в ряде случаев на меньшую величину, чем укорачиваются при его флексии, можно объяснить только коренным отличием характера деформации дисков у данных видов животных. По нашему предположению, у физически сформировавшихся собак при изгибании позвоночника диски только сжимаются или растягиваются в различных вариантах, у кошки же они, кроме того, способны сгибаться в поперечных направлениях.

Флексия позвоночника при фиксированной длине межкостистых интервалов меняет характер деформации межпозвоночного диска по сравнению с нормой. Жесткость связки в данном случае препятствует растягиванию дорсального края и приводит к компрессии диска по всей его площади. Прослеживается прямая и обратная связь между увеличением степени жёсткости надостистой связки и относительным укорочением межпозвоночных дисков. Возникновение отчётливо выраженной надостистой связки, вероятно, обусловлено появлением в галопе животных стадии переключенного полёта, а эволюционный переход копытных к дилокомоторному дорзостабильному способу локомоции мог быть, в значительной степени, процессом автоматическим.

**Влияние охлаждения на структуру и частотно-временные характеристики
акустических сигналов птенцов японского перепела**

Марченко Александра Александровна, Лемазина Алёна Алексеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

ptyhozoon@gmail.com, seaarlekino@mail.ru

Птенцы выводковых птиц вылупляются зрячими и хорошо опушёнными. Однако терморегуляция у них устанавливается через несколько дней, и в первые дни жизни птенцам необходим обогрев родителями. При охлаждении птенцы издают сигнал дискомфорта, что и стимулирует родителей начать обогрев. В нашей работе хотели

проследить, как влияет охлаждение на структуру и частотно-временные характеристики акустических сигналов птенцов японского перепела (*Coturnix japonica*).

Запись акустических сигналов птенцов осуществляли с 10 по 19 июля 2015 года на Звенигородской биологической станции им. С.Н. Скадовского биологического факультета МГУ. 8 птенцов японского перепела были разделены на две группы: 4 птенца участвовали в экспериментах каждый день (с 0 по 7 день после вылупления), а 4 участвовали только дважды: на 4 и 9 день после вылупления. Запись звуков проводилась индивидуально для каждого птенца. Птенца помещали в термостатическую камеру с температурой 18°C. Запись сигналов начиналась с момента помещения птенца в камеру. Звуки птенца записывали в течение 1 минуты с интервалом в 3-4 минуты. Температуру тела (T_b) птенца измеряли перед и после минуты записи звука. Также проводили запись звуков птенцов без охлаждения. Всего было записано 2014 звуков. Анализ звуков проводили в программе Avisoft SAS Lab Pro.

У птенцов с первого дня после вылупления четко различаются два сигнала: комфорта и дискомфорта. Комфортный сигнал имеет простую структуру без нелинейных феноменов. Сигнал дискомфорта также имеет простую структуру, но часто усложнен нелинейными феноменами различных типов. Основная частота (F_0) этих сигналов понижается с 2,8 кГц в первые сутки до 2 кГц на 5-й день после вылупления (момента приобретения птенцами эффективной терморегуляции), затем ее изменения носят только флуктуационный характер. При охлаждении в сигналах дискомфорта птенцов обеих групп энергетический максимум смещается с основной частоты на более высокие частоты. Возможно, такое смещение энергетического максимума стимулирует родителей к обогреву птенцов или к объединению выводка.

Популяционно-генетическое разнообразие и гибридизация ежей рода *Erinaceus* (Linnaeus, 1758) Европейской части России и Западной Сибири

Матвеева Екатерина Игоревна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

kate.matthew@yandex.ru

В Европейской части России обитает два вида рода *Erinaceus*: европейский ёж *E. europaeus* L., 1758 и южный ёж *E. roumanicus* В.-Нам., 1900. Известны две контактные зоны этих видов, причём центрально-европейский стык их ареалов изучен достаточно хорошо, а восточно-европейский, напротив, крайне слабо. Исследование вероятности гибридизации этих видов в Западной Европе дало отрицательный результат. Пилотные исследования в подмосковной популяции показали, что в восточно-европейской зоне перекрытия ареалов встречаются как особи обеих исходных популяций, так и гибридные.

Для типирования образцов использовали секвенирование полной последовательности митохондриального гена *cytb* и фрагмента 1-го интрона TTR, а также анализ 11 микросателлитных локусов. Обработка микросателлитных данных произведена в программе Structure 2.3.4. и надстройки для MS Excel GenAlex 6.501.

В результате генетического анализа выяснилось, что северные области (Тверская, Новгородская, Костромская и Владимирская) населяют «чистые» европейские ежи, в средне-южных (Липецкой, Брянской, Калужской, Саратовской, Тульской областях) и южных (Ростовской области, Краснодарском крае, Ставропольском крае, в Дагестане,

Кабардино-Балкарии, Калмыкии) регионах, а также в Башкортостане встречаются только «чистые» *E. roumanicus*. Представители обоих видов найдены в Удмуртии и Московской области, а особи со смешанным генотипом в Московской и Нижегородской областях. В Западной Сибири также найдены оба вида: в Тюменской области — европейский еж, а в Курганской, Омской и Новосибирской областях южный еж.

В смешанной популяции Московской области совпадение видового диагноза по генотипам отмечено для 68% особей, причём предположительно «чистых» южных ежей оказалось в два раза больше, чем «чистых» европейских. Для 32% всех генотипированных ежей диагноз по мтДНК разошелся с диагнозом по яДНК. В подавляющем большинстве случаев интрогрессированные особи несут митохондриальный гаплотип *E. europaeus*.

Полученные нами данные показывают, что ареал *E. europaeus* занимает намного более протяженную территорию, чем принято считать. Особи данного вида встречаются даже на территории Западной Сибири. Соответственно и зона перекрывания ареала тянется с востока на запад за пределы Московской области через Нижегородскую область и Северную Удмуртию.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00034а.

**Особенности структуры разновозрастных гибридных зон млекопитающих
(на примере хромосомных форм обыкновенной полевки *Microtus arvalis* s.str.)**

Миронова Татьяна Александровна

*Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН,
Россия, Москва
talmir84@mail.ru*

Естественная гибридизация свидетельствует о неполной репродуктивной изоляции между близкородственными, как правило, молодыми видами. Результаты сравнительного исследования генетической структуры разновозрастных зон гибридизации между одними и теми же формами позволяют провести эмпирическую проверку гипотезы «усиления» репродуктивных барьеров в зонах вторичного контакта.

Широко распространенные в Европейской части России обыкновенные полевки надвидового комплекса *Microtus arvalis* представлены двумя чётко дифференцированными хромосомными формами «*arvalis*» и «*obscurus*», имеющими спорный таксономический статус. Эти формы характеризуются парапатричными ареалами, а граница между ними, протянувшаяся в меридиональном направлении через несколько природных зон, предоставляет уникальную возможность для исследования временной динамики процессов гибридизации и видообразования.

В ходе многолетних полевых работ на территории Центрального Черноземья и Верхнего Поволжья накоплен значительный материал, который позволяет судить о структуре гибридных популяций на северных и южных участках ареала. Южный участок располагается в лесостепной зоне и, по-видимому, образовался вскоре после отступления ледников, тогда как расселение в северо-восточном направлении происходило вслед за антропогенной трансформацией территории.

Для северного участка характерен дефицит обеих родительских форм и преобладание особей с рекомбинантным генотипом. На южном участке отмечается преобладание одной из родительских форм (*obscurus*) и дефицит рекомбинантных особей. Для всей гибридной зоны отмечается асимметричная интрогрессия цитогенетических и

молекулярно-генетических маркеров. По цитогенетическим маркерам ширина гибридной зоны на южном участке составляет менее 2 км, а на северном участке – более 10 км. По молекулярно-генетическим маркерам ширина гибридной зоны в несколько раз больше. При этом наблюдается определенное несоответствие по митохондриальным и ядерным маркерам, что обусловлено тем, что митохондриальная ДНК легче передается через видовые границы благодаря наследованию по материнской линии и отсутствию рекомбинации.

Сдвиг гибридной зоны в сторону одного из родительских видов может вызываться асимметричной гибридизацией, асимметричным расселением родительских видов, конкуренцией, трансформацией ландшафта человеком.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-34-01373.

Различия в линейный размерах тела между самцами и самками кречета (*Falco rusticolus*) на основе статистической обработки

Нечаева Александра Владимировна

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
nechaeva-a@mail.ru*

Для большинства видов дневных хищников характерны различия в линейных размерах тела между самцами и самками. Целью нашей работы мы ставим выявить данные различия для кречета (*Falco rusticolus*) при помощи статистической обработки.

Работа по измерению птиц проводилась летом 2015 года на основе коллекции зоологического музея МГУ, в состав выборки входят как взрослые, так и ювенильные особи. Для описания каждой птицы были сделаны девять основных промеров.

Всего обработано 104 особи кречета, из них: 53 ювенильные особи и 51 взрослый кречет. Сравнение между возрастными группами проводилось с использованием *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимых отличий ни по одному из параметров между первыми и вторыми найдено не было, поэтому выборка по ним была разделена на две подгруппы по полу без учета возрастной категории. Далее для анализа также был применен *t*-критерия Стьюдента. Между самками и самцами статистически значимые различия найдены в восьми из девяти анализируемых критериев: длина хвоста, крыла, цевки и ее неоперенной части, ширина и высота клюва, его длина, измеренная от переднего края ноздри до кончика надклювья и от ближнего к надклювью края восковицы до его кончика. Во всех случаях самки оказались крупнее самцов. Анализ не показал статистически значимых различий между самцами и самками в длине вершины крыла.

По результатам анализа можно говорить о том, что по большинству рассматриваемых нами линейных размеров тела самки кречета крупнее самцов. Для данного вида справедлива характеристика отряда в целом. Так как считается, что разница в размерах нужна для охвата большего диапазона добычи, полагаем, что в данном контексте параметр, не показавший различий, является второстепенным для данной функции.

О применимости методики Кузнецова-Терещенко для расчёта боковой и вертикальной подвижности между процельными позвонками

Пащенко Дмитрий Иванович

*Палеонтологический институт имени А.А. Борисяка,
лаборатория палеогерпетологии, Россия, Москва*

d-catulus@yandex.ru

Существующая методика Кузнецова-Терещенко для расчёта боковой и вертикальной межпозвоночной подвижности разработана исключительно для платицельных позвонков, которыми обладают современные млекопитающие и многие ископаемые пресмыкающиеся. В настоящей работе сделана первая попытка установить, можно ли применять эту методику к процельным позвонкам, присутствующими у большинства современных пресмыкающихся и земноводных. Для анализа использовали три полных позвоночных столба крокодилов (*Crocodylidae gen. indet.*), хранящихся в коллекции кафедры зоологии позвоночных СПбГУ, с которых мы сняли промеры согласно вышеуказанной методике, а также оценили их подвижность в сочленённом состоянии.

По результатам расчётов мы построили графики межпозвоночной подвижности исследованных позвоночных столбов. Полученные данные хорошо согласуются с описанными в литературе визуальными наблюдениями над подвижностью позвоночника у живых крокодилов во время наземной и водной локомоции. Только численные данные, рассчитанные для хвостового отдела, не имеют физического смысла, приобретая, в том числе, отрицательные значения. Это связано с тем, что в методике в качестве исходных данных используются главным образом промеры фасеток сочленовных отростков позвонков, в то время как в хвостовых позвонках крокодилов главную роль в подвижности играют сочленения между телами, а не сочленовными отростками. Также в ходе исследования было обнаружено, что первый хвостовой позвонок крепко соединён связками со вторым крестцовым позвонком, утрачивая подвижность относительно последнего.

Таким образом, по результатам исследования мы можем сделать следующие выводы:

- 1) указанная методика пригодна, по крайней мере, для грубого расчёта межпозвоночной подвижности у животных, обладающих процельными позвонками;
- 2) методика не годится для тех участков позвоночного столба, где сочленовные отростки позвонков получают слабое развитие (как в хвостовом отделе позвоночника крокодилов);
- 3) тазовый отдел позвоночного столба крокодилов функционально включает в себя не два, а три позвонка.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-00115 и 15-04-05049.

Плейстоцен-голоценовая фауна Якутии по археозоологическим материалам

Пономарёв Иван Васильевич

Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова,

Россия, Якутск

ivan.sauropsida@mail.ru

Изучение доисторических фаун необходимо для понимания становления современных фаунистических комплексов, для палеоклиматических и палеоэкологических реконструкций. Особый интерес здесь представляют субфоссильные костные остатки верхнеплейстоценовых и голоценовых слоев, поскольку фауны этих эпох непосредственно предшествовали современным. Эти эпохи на территории северо-востока Евразии характеризуются появлением человека, чьи стоянки и поселения часто выступают источником костных останков различных животных. Особенность костеносных слоёв антропогенного происхождения в том, что практически все находимые там млекопитающие и многие птицы представляли промысловый интерес.

Изучен остеологический материал из палеолитических стоянок Хайыргас, Джампа и поселений средневековья – нового времени Буор-хая I, II, III и Хомустаах: сотни фрагментов костей различных млекопитающих и птиц, подвергшихся частичной минерализации.

Хайыргас находится в Олёкминском районе Республика Саха (Якутия), представляет собой пещеру, где слои подразделяются на верхнеплейстоценовые и голоценовые. В верхнеплейстоценовых слоях отмечается смешение видов из разных фаунистических комплексов: мамонтовый (мамонт, шерстистый носорог, ленская лошадь, бизон), таежный (лось, косуля) и горный (баран – снежный или архар). Голоценовые слои представлены лишь таёжными видами: бурый медведь, лось и северный олень (вероятно, лесной подвид).

Археологический памятник Джампа располагается на границе Ленского и Олёкминского районов. Он представляет собой грот, где костеносные слои хронологически соответствуют неолиту – бронзовому веку. В остеологическом спектре доминируют костные остатки птиц. Количество костей крупных млекопитающих незначительно, они известны лишь по единичным фрагментам. Среди териофауны доминируют костные остатки зайцеобразных и грызунов. Возможно, это связано с деятельностью хищных птиц.

Поселения Буор-хая I, II, III и Хомустаах хронологически соответствуют средневековью и новому времени. Помимо остеологического материала диких таежных млекопитающих, встречаются костные остатки домашних видов: корова и лошадь.

Остеологический материал из антропогенных костеносных слоев позволяет судить об изменении фауны Якутии, начиная с мамонтового фаунистического комплекса и его вымирания вплоть до добавления домашних видов к таежной фауне в среднем голоцене.

Вкусовые предпочтения и пищевое поведение нильской тилапии

Oreochromis niloticus

Семячкова Александра Дмитриевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

al7_ra@list.ru

В последние годы проводится много работ по определению вкусовых предпочтений рыб, особенностей поведения при оросенсорном тестировании кормовых объектов. Однако эти задачи редко решаются на объектах аквакультуры. Мы изучали вкусовые предпочтения и пищевое поведение нильской тилапии *Oreochromis niloticus* – важнейшего объекта культивирования.

Опыты выполнены на 12 особях ($L = 6.5-7.0$ см). Рыб содержали поодиночке в аквариумах (10 л) при естественном режиме освещения и $t_{\text{воды}} = 24^{\circ}\text{C}$ (терморегуляторы AquaEl EH 25 W).

В опыте рыбам поштучно предлагали агар-агаровые гранулы (2%), содержащие краситель Ponceau 4R ($5\mu\text{M}$) и один из тестируемых стимулов: классические вкусовые вещества (0.1 M), свободные аминокислоты (L-стереоизомеры, 0.1–0.001 M), сахара (0.1 M) и водный экстракт личинок Chironomidae (175 г/л). В качестве контроля использовали гранулы, содержавшие только краситель. В каждом опыте фиксировали потребление и число схватываний гранулы, а также длительность латентного периода и периодов удержания гранулы после первого схватывания и суммарно за весь опыт.

Большинство веществ вызывали значимое усиление потребления гранул: три классических вкусовых вещества – лимонная кислота, сахароза, CaCl_2 ; девять аминокислот – цистеин, норвалин, изолейцин, валин, глутамин, лизин, фенилаланин, треонин, метионин; девять сахаров – сорбитол, глюкоза, манноза, лактоза, маннитол, фруктоза, галактоза, сахароза. Остальные вещества были для тилапии индифферентными по вкусу. Детергентные вещества не обнаружены. Продолжительность латентного периода реакции рыб на гранулу варьировала незначительно (2.3–4.6, 1.1–2.2, 1.4–2.0 сек. в серии с классическими вкусовыми веществами, свободными аминокислотами и сахарами соответственно) и не зависела от вкусовой привлекательности. В большинстве случаев рыбы заглатывали гранулу или отказывались от потребления после первого схватывания. В связи с этим, продолжительность удержания гранулы после первого схватывания и в течение всего опыта была близкой или совпадала. Наиболее привлекательные по вкусу гранулы дольше удерживались рыбами во рту. Сведения о вкусовых предпочтениях и пищевом поведении тилапии могут представлять интерес для совершенствования технологии выращивания этих рыб.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-00322).

Филогенетические отношения в группе видов «*Sorex araneus*»

Чернецкая Дарья Михайловна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
gnomicha@yandex.ru

В роде землероек-бурозубок *Sorex* выделяют группу видов «*araneus*». От других бурозубок её представители отличаются кариотипом, а именно наличием полового тривалента XY1Y2. Всего к ней относится 10 видов: *S. arcticus*, *S. maritimensis*, *S. araneus*, *S. tundrensis*, *S. asper*, *S. satunini*, *S. daphaenodon*, *S. granarius*, *S. coronatus*, *S. antinorii*. Исходя из преобладающих взглядов на эволюцию кариотипов, *S. granarius* занимает базальное положение относительно *S. araneus*, *S. coronatus* и *S. antinorii* на хромосомном филогенетическом дереве. По митохондриальным данным базальной ветвью группы является вид *S. arcticus*, далее последовательно ответвляются *S. tundrensis* и *S. daphaenodon*, а группировка, образованная видами *S. coronatus*, *S. araneus* s.str., *S. granarius* и *S. antinorii*, оказывается наиболее далека от корня, причем наиболее обособленной из этих последних четырех видов оказывается *S. coronatus*, а дивергенция *S. granarius* от *S. araneus* очень мала. *S. satunini* полифилетична: одна её ветвь оказывается ближе всего к *S. antinorii*, дополняя вышеописанную группировку, а другая ветвь радикально отличается и максимально удалена от всех остальных представителей группы. По результатам анализа ядерных генов в основании дерева помещается *S. tundrensis*, далее следует *S. daphaenodon*, *S. coronatus*. *S. arcticus*, *S. araneus* s. str. и *S. satunini* образуют сестринскую группу, которая оказывается наиболее далекой от корня дерева. *S. satunini* монофилетична. При относительно уверенной митохондриальной реконструкции, приведенные ядерные данные являются предварительными вследствие невысоких поддержек большинства узлов. Для получения разрешенной филогении требуется значительное увеличение числа ядерных локусов.

Исследование финансировано грантом РФФИ 04-14-00034.

Особенности видового состава летучих мышей на зимовках

Ленинградской области

Щеховский Егор Александрович

Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет
Россия, Санкт-Петербург
shchekhovskii@mail.ru

До настоящего времени всё ещё актуален вопрос о предпочтении разными видами летучих мышей тех или иных массовых зимовок. Дело в том, что количество зимовок ограничено, и они достаточно далеко расположены друг от друга, что заставляет некоторые виды рукокрылых мигрировать на зимовки с больших территорий летних местообитаний. Для зимовок можно оценить видовой состав и численность рукокрылых, а также сделать попытку выяснить их значение для местных популяций.

Учёт численности проходил в зимне-весенний период с декабря по апрель в 2013–2014 и 2014–2015 гг. в составе небольшой исследовательской группы; было обследовано 20 пещер-штолен. Учёт проводили методом прямого наблюдения с минимальным воздействием на летучих мышей, во время которого для измерения температуры и влажности использовали психрометры.

В ходе исследования обнаружили 2348 особей в 2014 г. и 2232 особей в 2015 г. На зимовках отмечены шесть видов. Измерение температурного режима и влажности показало, что наибольшая температура (12,5°) и влажность (100%) отмечена в Староладожских и Саблинских пещерах, а наиболее холодными (0,7°) и сухими (54%) являются Телезские пещеры. Промежуточное положение занимают остальные группы пещер. Район обитания играет роль при выборе зимовки для большинства видов. Пещеры привлекают виды, обитающие в окружающих биотопах. Антропогенное воздействие было отмечено везде.

На территории Ленинградской области можно выделить три основные массовые зимовки, где преобладает один вид: Староладожские пещеры – прудовая ночница *Myotis dasycneme* (Voie, 1825), Саблинские пещеры – ночница Наттерера *Myotis nattereri* (Kuhl, 1817), Телезские пещеры – ночница Брандта *Myotis brandtii* (Eversmann, 1845). Это связано с наличием в указанных пещерах оптимальных условий микроклимата, с соседством с биотопами, где они обитают, а также с различным распространением видов по территории области, что чётко выражено в наличии или отсутствии видов в разных группах пещер. Помимо этого сказывается фактор беспокойства, который существенно влияет на динамику численности в зимний период. Данную работу необходимо продолжать как для мониторинга, так и для изучения роли зимовок для каждого вида, что можно использовать для совершенствования методов охраны рукокрылых.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГИСТОЛОГИЯ

Трансплантация клеток нервного гребня из волосяного фолликула в головной мозг мыши

Бейлин Аркадий Константинович

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

Институт биологии развития имени Н.К.Кольцова РАН, Россия, Москва

bakinstone@gmail.com

Клетки нервного гребня из волосяного фолликула рассматриваются как перспективный материал для клеточной терапии повреждений нервной ткани. Целью данной работы являлось исследовать свойства и судьбу трансплантатов из клеток нервного гребня из волосяного фолликула при трансплантации в головной мозг мыши.

Клетки нервного гребня были получены из области bulge вибрисс взрослых трансгенных мышей линии C57BL, несущих ген GFP под промотером актина. В ряде опытов культуры перед трансплантацией подвергали дифференцировке в нейральном направлении. Анализ культур клеток и срезов головного мозга проводился иммуноцитохимическим и иммуногистохимическим методами, соответственно.

Разработанная в более ранних работах методика позволила успешно выделить и размножить в культуре стволовые клетки из нервного гребня из области bulge вибрисс мышей. Клетки экспрессировали нестин, β III-тубулин, фибронектин и виментин, что подтвердило происхождение выделенной популяции клеток из нервного гребня, а экспрессия GFAP, NEUN и SOX10 указывала на эффективность дифференцировки в нейральном направлении. Анализ суспензионных трансплантатов показал, что трансплантаты с предварительной дифференцировкой в нейральном направлении выживают лучше, чем трансплантаты, чьи клетки не подвергали подобной обработке. Максимальный срок переживания трансплантата составил 28 сут. Отмечено реципрокное прорастание волокон трансплантата в ткань головного мозга реципиента, а также миграция клеток трансплантата из области трансплантации вглубь ткани и по сосудам головного мозга. Отсутствовала глиальная реакция на клетки трансплантата. Были начаты работы по влиянию на эффективность трансплантации внеклеточного матрикса и агрегации клеток.

Таким образом, клетки нервного гребня из волосяного фолликула демонстрируют ряд положительных для использования в клеточной терапии свойств, а именно: легкодоступность, возможность наращивания в культуре, возможность дифференцировки в нейральном направлении, возможность создания аутологических трансплантатов, выживание в нейральном микроокружении и формирование благоприятных условий для роста отростков нервных клеток реципиента, низкая глиальная реакция на клетки трансплантата, а также интеграция и миграция клеток трансплантата в нервную ткань. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования данного типа клеток для стимулирования регенерации нервной ткани.

Работа была поддержана грантом «Разработка новой биомедицинской технологии лечения повреждений нервной ткани, основанной на использовании клеток взрослого человека, происходящих из нервного гребня» программы президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработок биомедицинских технологий».

Влияние ресвератрола на изменение количества стволовых клеток *in vitro*

Беляева Александра Викторовна

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Беларусь, Минск,

Aleksandra447@yandex.ru

В настоящее время частота возникновения сердечно-сосудистых заболеваний возросла в несколько раз. Данные патологии становятся основными причинами нетрудоспособности и преждевременной смертности людей. В связи с этим разработка новых эффективных препаратов и их комбинаций для лечения сердечно-сосудистых заболеваний является актуальным во всем мире.

Ресвератрол – природный антиоксидант, который обладает кардиопротекторными, нейропротекторными, противовоспалительными, противоопухолевыми свойствами. В ходе проведения данной работы было изучено влияние ресвератрола в различных концентрациях на число стволовых клеток с фенотипом CD117+ (клетки-предшественники эндотелия) в культуре клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6 с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

В результате проведенного анализа выявлено дозозависимое увеличение количества исследуемых клеток *in vitro*. Установлено, что применение ресвератрола в концентрации 1 мкг/мл и в концентрации 10 мкг/мл не приводит к изменению числа стволовых клеток CD117+ в культуре клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6 (значения исследуемого показателя в данных образцах соответствовали значению такого параметра в контроле). При использовании природного антиоксиданта в концентрации 30 мкг/мл отмечено значительное увеличение количества стволовых клеток с фенотипом CD117+ по сравнению с таковыми значениями в контроле и пробах с ресвератролом в концентрации 1 мкг/мл и в концентрации 10 мкг/мл ($p < 0,05$). Выявлено, что применение изучаемого вещества в концентрации 50 мкг/мл приводит к еще большему увеличению доли клеток с CD117+ ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты исследования влияния ресвератрола на число стволовых клеток CD117+ в культуре клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6 позволяют сделать заключение, что изучаемый природный антиоксидант способствует стимуляции образования клеток CD117+ *in vitro*. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях при разработке новой рецептуры комбинированного препарата (в состав которого входит ресвератрол) для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, обладающего свойством стимуляции мобилизации стволовых клеток.

Влияние локальной доставки генетически модифицированных клеток крови пуповины человека на экспрессию детерминант шванновских клеток

при травме спинного мозга

Галиева Луиза Рамилевна, Санатова Эльвира Руслановна,

Гаранина Екатерина Евгеньевна

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

Россия, Казань

Loisa_@mail.ru

При травме спинного мозга происходит гибель олигодендроцитов, которые миелинизируют аксоны центральной нервной системы (ЦНС). При этом неповрежденные

аксоны, лишённые миелиновой оболочки не способны к проведению нервного импульса. Интересно, что шванновские клетки, миелинизирующие аксоны периферической нервной системы, способны мигрировать в повреждённую ЦНС и участвовать в ремиелинизации аксонов. Какие факторы влияют на миграционный потенциал шванновских клеток и их выживаемость в области травмы до сих пор не изучено.

В данной работе мы исследовали влияние созданной генно-клеточной конструкции на экспрессию детерминант шванновских клеток при травме спинного мозга. В качестве модели была использована дозированная контузионная травма спинного мозга крыс породы Wistar, которым проводили трансплантацию в эпицентр травмы моноклеарных клеток крови пуповины человека (МККП), несущих гены *vegf* (сосудистый эндотелиальный фактор роста) и *gdnf* (глиальный нейротрофический фактор). Двумя контролями служили группы: (1) трансплантация МККП с геном усиленного зеленого флуоресцентного белка (*egfp*) и (2) травма спинного мозга без введения клеток.

Для оценки миграции шванновских клеток проводились иммуногистохимические реакции срезов спинного мозга с АТ против Р0. Вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени подтвердили данные, полученные иммуногистохимическими методами. Белок Р0, характерный только для периферического миелина, был обнаружен на 30 сутки после травмы спинного мозга в группе с трансплантацией МККП и в группе без инъекции клеток. В группе без использования терапии большая часть Р0⁺-миелина была дезинтегрирована, однако в группе с введением МККП дезинтеграция практически не наблюдалась. Так же были обнаружены шванновские клетки, миелинизирующие несколько аксонов, хотя в периферической нервной системе шванновские клетки способны к миелинизации только одного аксона.

Результаты исследования позволили сделать вывод, что шванновские клетки с фенотипом Р0 являются, по всей видимости, мишенями поддерживающего влияния фактора трансплантации МККП, а не доставки терапевтических генов.

**Сравнительное исследование эффективности кратковременного
внутрибрюшинного введения митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1
и его фрагмента С12ТРР в модели острого асептического подкожного воспаления у
мышей линии С57В1/6**

Дворянинова Екатерина Евгеньевна, Челомбитько Мария Александровна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

Katya.Dvoryaninova@yandex.ru

Митохондриальные активные формы кислорода (мтАФК) стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов и обеспечивают развитие иммунного ответа; для изучения роли мтАФК используют митохондриально-направленные соединения. Одним из таких соединений является SkQ1, характеризующийся широким диапазоном доз, в которых он проявляет антиоксидантное действие, и относительной химической стабильностью. И SkQ1, и фрагмент его молекулы без пластохинонового остатка (С12ТРР) *in vitro* ингибируют TNF-индуцированную активацию эндотелия.

В настоящей работе для оценки действия SkQ1 использована модель подкожного «воздушного мешка» у мышей линии С57В1/6; воспалительный процесс был индуцирован введением λ-каррагинана в предварительно сформированную путём двукратного введения стерильного воздуха субдермальную полость в межлопаточной области. В качестве

препарата сравнения был выбран С12ТРР. Исследуемые вещества вводились внутривентриально в дозе 250 нмоль/кг в течение 1 недели до индукции воспаления.

Исследование показало, что введение SkQ1 оказывает противовоспалительный эффект, выражающийся в достоверном уменьшении числа клеточных форм в воспалительном экссудате на 30,1% ($p < 0,05$) и тенденции к снижению концентрации провоспалительного цитокина IL-6 на 43,8% ($p < 0,1$). При применении С12ТРР изменений в составе экссудата из области экспериментального воспаления по исследуемым параметрам обнаружено не было. На тканевом уровне введение SkQ1 и С12ТРР снижает абсолютную численность тучных клеток в дерме на 26,8% и 28,7% соответственно ($p < 0,05$). При этом SkQ1 увеличивает долю дегранулирующих тучных клеток на 64,8% ($p < 0,05$), а С12ТРР - уменьшает на 59,5% ($p < 0,05$).

Таким образом, можно заключить, что SkQ1 в модели острого воспаления, вызванного λ -каррагинаном, в субдермальном мешке у мышей оказывает заметный противовоспалительный эффект как по сравнению с физраствором, так и по сравнению с С12ТРР. Данный эффект выражен, главным образом, в достоверном снижении лейкоцитов, а также в тенденции к снижению концентрации провоспалительного цитокина IL-6 в воспалительном экссудате.

Онтогенез клеток антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы

Доронина Татьяна Валерьевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

matveevatatiana.94@yandex.ru

Клетки антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы – удобная модель для изучения процесса программируемой клеточной гибели растений. Основная функция комплекса – синтез веществ, необходимых формирующемуся эндосперму. На стадии дифференцировки антиподальных клеток после эндоредупликации ДНК формируются гигантские политенные хромосомы. Цель работы - проследить структурно-функциональные особенности клеток антиподального комплекса.

В работе изучались фиксированные семяпочки. Использовались следующие методы: получение тотального препарата и окрашивание его клеток гематоксилином Каррараччи; цитофотометрия ДНК ядер; серебрение аргентофильных белков ядрышка; иммуноцитохимическая детекция ЭПР, микротрубочек, ядрышек, аппарата Гольджи, выявление разрывов в ДНК по методу Tunnel, электронномикроскопическое исследование.

Кластер антиподальных клеток последовательно проходит стадии пролиферации, дифференцировки и программируемой клеточной гибели. После эндополиплоидизации в пределах одного кластера существуют клетки с низко-, средне- и высокополиплоидными ядрами. В центре располагаются низкополиплоидные клетки (с небольшими округлыми ядрами, равномерно заполненными хроматином), их окружают среднеполиплоидные, на краю кластера располагаются высокополиплоидные, с ядрами большого размера и четко дифференцированными хромосомами. Затем их ядра уплощаются, перестают выявляться отдельные хроматиды. В клетках имеется два-четыре крупных ядрышка и зоны мини-ядрышек. Во время клеточной гибели ядрышки диссоциируют на отдельные белковые комплексы, фибрилларин и аргентофильные белки перемещаются на поверхность хромосом, частично оставаясь в зоне рибосомных генов. В цитоплазме антиподальных клеток выявляется хорошо развитый ЭПР и многочисленные диктиосомы, которые на

ранних стадиях развития кластера занимают большую часть свободной цитоплазмы, на поздних стадиях располагаются по периферии клетки и в меньшей степени вблизи инвагинаций ядерной оболочки. Пучки микротрубочек антиподальных клеток имеют вид тонких извитых протяженных фибрилл. Окрашивание ядер методом Tunel выявило разрывы, образующиеся в ходе эндополиплоидизации и клеточной гибели клеток.

Ядра антиподальных клеток различаются по плоидности, величине и расположению в кластере. Присутствие ярко выраженного ЭПР и диктиосом в цитоплазме позволяет предположить, что антиподальные клетки выполняют активную секреторную функцию. На разных стадиях онтогенеза комплекса эти органеллы по-разному локализуются и имеют свои структурно-функциональные особенности. Цитоплазматические структуры в процессе развития дольше остаются в нативном состоянии, чем хроматин ядра.

Вариабельность объема гепатоцитов и содержание гликогена при хронической сердечной недостаточности

Дьяченко Анастасия Олеговна¹,

Байдюк Екатерина Викторовна², Честнова Анна Юрьевна²

¹ФГАОУ ВО “Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого”, Россия, Санкт-Петербург

*²ФГБУН Институт цитологии РАН, Россия, Санкт-Петербург
hakumi_hideki@mail.ru*

Основной причиной смерти в мире являются сердечно-сосудистые заболевания, при которых развиваются тяжелые поражения печени. Цель настоящей работы — оценить морфологическое состояние печени крыс после экспериментального инфаркта миокарда (ИМ) и инфаркта миокарда, осложненного перикардитом (ИМОС), содержание общего гликогена (ОГ), вариабельность объема гепатоцитов.

ИМ вызывали методом перманентного лигирования левой коронарной артерии, у части крыс помимо ИМ развился перикардит. Материал получали через 6 мес. после инициации ИМ. Срезы печени окрашивали гематоксилин-эозином и пикросириусом. Измерения объема гепатоцитов и содержания ОГ в них проводили на препаратах-мазках. Для определения содержания ОГ использовали флуоресцентный вариант PAS-реакции. Объем клеток рассчитывали по соответствующим значениям их сухой массы.

У контрольных крыс паренхима печени имела нормальную структуру. После ИМ на срезах были выявлены очаговые некрозы, диффузные лейкоцитарные инфильтраты и расширенные просветы сосудов с утолщенными стенками. Паренхима печени прорастала соединительнотканными тяжами по ходу синусоидов. У крыс с ИМОС, кроме вышеуказанных нарушений, выявлено жировое перерождение печени. Обнаружены широкие соединительнотканые тяжи, проходящие вдоль паренхимы печени и обширные зоны некроза. Через 6 мес. после операции объем гепатоцитов у крыс с ИМ увеличился в 1.2 раза, у животных с ИМОС — в 1.5 раза по сравнению с контролем. Коэффициент вариации объема гепатоцитов у контрольных крыс составил 16.9 % , у крыс с ИМ — 34.3 %, у группы животных с ИМОС — 38.5 %. Содержание ОГ уменьшилось в обеих опытных группах животных.

Воспалительные и некротические процессы в печени крыс при хронической сердечной недостаточности приводят к усилению фибротизации и васкуляризации ее

паренхимы. Регенерация патологически измененной печени происходит в основном за счет гипертрофии гепатоцитов, что выражается в увеличении их объема. Коэффициент вариации свидетельствует о неоднородности клеток печени по размеру у крыс опытных групп. ИМ приводит к изменению метаболизма углеводов в печени. Увеличение объема клеток не связано с накоплением гликогена.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-00730_a.

Влияние краткосрочного гипоксического стресса на иммуносупрессивную активность периваскулярных мезенхимных стромальных клеток

Зорникова Ксения Викторовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

kse2574@yandex.ru

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) – малодифференцированные стромальные предшественники, способные дифференцироваться по различным направлениям, влиять репарацию, регенерацию и иммунный ответ, благодаря способности секретировать различные биологически активные соединения. МСК присутствуют во многих тканях организма, в том числе и в строме костного мозга, которая является основной нишей МСК. Известно, что концентрация кислорода в организме ниже атмосферной (1-10%), то есть такая «гипоксия» является «физиологической номоксией» для МСК.

Целью данного исследования является изучение влияния краткосрочного гипоксического воздействия на иммуносупрессивную активность МСК.

В ходе работы производилось сокультивирование МСК и активированных лимфоцитов при 20% и 5% кислорода. Для этого использовались клетки, полученные из периферической крови и жировой ткани здоровых доноров. В работе использовались такие методы, как иммуноцитохимия, фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия, конфокальная микроскопия, проточная цитофлуориметрия и иммуноферментный анализ.

В ходе исследования были получены следующие результаты. При определении активирующего агента для лимфоцитов оказалось, что наилучшими являются фитогемагглютинин и конканвалин. При анализе культуры лимфоцитов без добавления МСК было выяснено, что процентное содержание различных типов лимфоцитов выше при 20% кислорода (исключение составили естественные киллеры, содержание которых было выше при 5%). Однако при сокультивировании МСК и ФГА-активированных лимфоцитов изменяется их субпопуляционный состав. При этом эффект не зависит от содержания кислорода. Взаимодействие МСК и ФГА-активированных лимфоцитов приводит к значительному увеличению доли клеток, экспрессирующих маркеры ранней и поздней (CD69, HLA-DR), и незначительному увеличению средней (CD25) активации. В условиях пониженного содержания кислорода эффект активации менее выражен. Содержание кислорода не влияет на пролиферативную активность и выживаемость как МСК, так и активированных лимфоцитов.

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы. Наилучшими активирующими агентами являются фитогемагглютинин и конканвалин. Пониженное содержание кислорода не влияло на пролиферативный потенциал МСК.

Сокультивирование с МСК приводило к уменьшению доли В- и НК-клеток и увеличению доли НКТ-клеток, Т-киллеров и активированных Т-лимфоцитов. Пониженное содержание кислорода усиливало супрессорные свойства МСК в отношении всех субпопуляций, за исключением В-клеток и Т-хелперов, доля которых увеличилась.

Анализ корреляции способности трансформированных фибробластов хомяка к мезенхимально-амебоидному переходу с их метастатическим потенциалом

Малеева Александра Владимировна

*МГУ имени М.В. Ломоносова; ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, НИИ Канцерогенеза, лаборатория механизмов канцерогенеза, Россия, Москва
maleevainform@rambler.ru*

Опухолевые клетки имеют измененные по сравнению с нормальными клетками молекулярные механизмы, регулирующие их движение, и морфологию. Для них характерна пластичность миграционных процессов. Это позволяет клеткам в зависимости от условий менять тип движения с мезенхимального, характеризующегося образованием филоподий или ламеллиподий, на амебоидный, характеризующийся образованием бляшек. Такой мезенхимально-амебоидный переход (МАП) приводит к более эффективной миграции и расселению по организму и, соответственно, к образованию метастазов. Каждый тип движения характеризуется определенным строением цитоскелета.

Целью данной работы было исследовать предполагаемую корреляцию между метастатическим потенциалом опухолевых клеток и их морфологией, строением цитоскелета и способностью к МАП на линиях, для которых ранее это не было описано.

В качестве экспериментальной модели в проведенном исследовании использовалась панель линий эмбриональных фибробластов сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus Waterh*), трансформированные вирусом саркомы Рауса штамм Шмидт-Руппин D. Панель включает в себя исходно низкометастазные варианты (линия HET-SR), исходно высокометастазные варианты (линии HET-SR1, HET-SR8) и линию, приобретающую высокометастазный фенотип в ходе селекции *in vivo* (HET-SR-LNM). Изучение структур цитоскелета проводилось с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии. Для оценки способности клеток к МАП использовали ингибитор полимеризации актина СК-666, который по литературным данным вызывает переход на амебоидное движение опухолевых клеток. Движение клеток в ответ на добавление ингибитора СК-666 фиксировалось с помощью прижизненной DIC-микроскопии.

В результате было показано, что клетки с различным метастатическим потенциалом отличаются по морфологии, организации цитоскелета (расположение актиновых и промежуточных филаментов). Исследованные клетки демонстрируют разную способность МАП в ответ на добавление ингибитора СК-666: на амебоидный тип движения переходят все клетки линии HET-SR8, 90% клеток линии HET-SR1, 75% клеток линии HET-SR и только 54% клеток линии HET-SR-LNM. Сниженный ответ клеток линии HET-SR-LNM можно объяснить множественной лекарственной устойчивостью, характерной для этой линии.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов с использованием ингибитора СК-666 подтверждают гипотезу о том, что пластичность опухолевых клеток тем выше, чем выше степень их метастазирования.

Оценка экспрессии генов *S100*, *Pmp2*, *Pmp22* в поврежденном седалищном нерве крысы при стимуляции регенерации

мезенхимными стволовыми клетками жировой ткани

Мухаметова Лилия Рамзовна

Масгутова Галина Андреевна, Масгутов Руслан Фаридович, Гаранина

Екатерина Евгеньевна, Ризванов Альберт Анатольевич

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

vixen_133@mail.ru

Аутонервная пластика является самым распространенным подходом для преодоления дефекта поврежденного нерва. В работе проведена сравнительная оценка экспрессии генов *S100*, *Pmp2*, *Pmp22* периферического отрезка нерва после аутонервной пластики и стимуляции регенерации мезенхимными стволовыми клетками на сроках 30 и 60 суток после травмы.

В работе в левом и правом седалищном нерве формировали диастаз длиной 1 см. Замещение дефекта нерва производили отрезком нерва контралатеральной стороны с последующим сшиванием конец-в-конец. В левом седалищном нерве, по длине вставки, производили аппликацию с тиссуколом с растворенными в нем мезенхимными стволовыми клетками (МСК). Оценку экспрессии генов осуществляли методом Real Time PCR. Контролем служили интактные животные. Полученные данные были обработаны относительно гена *18S* в программе Excel. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Анализ образцов показал, что уровень экспрессии гена *S100* на 30 сутки увеличился на 32,1% в образцах левого отрезка нерва и снизился на 70,3% образцах правого нерва по сравнению с экспрессией гена интактных животных. На 60 сутки в образцах левого отрезка нерва экспрессия гена достигла уровня экспрессии интактных животных, но осталась сниженной на 32,2% в образцах правого нерва. На 30 сутки после травмы визуализация гена *Pmp22* показала снижение на 31,3% в образцах левого отрезка нерва и увеличение на 82,8% образцах правого отрезка нерва. Для гена *Pmp2* на 30 сутки после травмы нами зафиксировано снижение экспрессии на 95% в образцах левого отрезка нерва и на 27,9% правого отрезков нерва.

Таким образом, оценка экспрессии генов методом Real Time PCR дает представление об эффективности регенерации седалищного нерва после его травмы.

Влияние окислительного стресса на фрагментацию митохондрий дрожжей

Рогов Антон Геннадьевич, Овченкова Александра Петровна

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы

биотехнологии» РАН, институт биохимии имени А.Н. Баха, лаборатория биоэнергетики,

Россия, Москва

lloss@rambler.ru

Термин «окислительный стресс» в настоящее время используется для обозначения повышенной внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК). В клетке основными источниками АФК являются митохондрии. Избыточная продукция АФК митохондриями связана, как правило, с их дисфункцией и представляет серьезную угрозу для жизни клетки. Целью работы явилось изучение взаимосвязи между индуцированным окислительным стрессом и фрагментацией митохондрий дрожжей аэробного типа обмена *Dipodascus magnusii*. Дрожжи *D. magnusii* имеют относительно большие размеры клеток и

в норме обладают разветвленной митохондриальной сетью, что делает их перспективной моделью для изучения фрагментации митохондрий методом флуоресцентной микроскопии. Показано, что под действием окислительного стресса, индуцированного трет-бутил гидропероксидом (*t*-ВНР), митохондрии дрожжей *D. magnusii* утрачивали сетевидную структуру. В целях предотвращения или ослабления действия окислительного стресса, вызванного прооксидантом, и его последствий, использовали митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ1 и SkQT1. Преинкубация с антиоксидантами снижала уровень окислительного стресса в клетках дрожжей. Впервые было показано, что применение мембранотропных антиоксидантов SkQ1 и SkQT1 в низких концентрациях не только предотвращало фрагментацию митохондрий, но и обращало её, т.е. возвращало фрагментированным вследствие воздействия окислительного стресса митохондриям *D. magnusii* их природную сетевую структуру.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00107.

Влияние трансплантации клеток микроглии в область нейротравмы на структурные и функциональные показатели

Санатова Эльвира Руслановна, Журавлева М.Н., Галиева Л.Р., Мухамедшина Я.О.

*ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань
elyaelya18@gmail.com*

Одним из подходов для предотвращения последствий травмы спинного мозга (ТСМ) и поддержания регенерации нервных волокон является клеточная терапия. В последнее время интерес многих исследователей направлен на клетки микроглии. В поврежденном спинном мозге кластеры из микроглии обычно связаны с прорастанием поврежденных аксонов. Этот феномен может быть объяснен выработкой нейротрофинов и факторов роста или активированием глии в области рубца, которая впоследствии продуцирует трофический градиент. В связи с этим представляет большой интерес исследование клеток микроглии с позиции сдерживания патологических реакций при травме спинного мозга.

В качестве модели была выбрана дозированная контузионная травма спинного мозга крысы. Проведена немедленная однократная инъекция в область повреждения клеток микроглии, трансдуцированных рекомбинантным аденовирусным вектором с геном глиального нейротрофического фактора (Ad5-GDNF). В качестве контрольных групп были исследованы: (1) ТСМ с трансплантацией клеток микроглии, трансдуцированных Ad5-EGFPc геном усиленного зеленого флуоресцентного белка и (2) ТСМ без введения клеток.

В исследовании проведена оценка сохранности ткани в области повреждения экспериментальных групп. Исследование восстановления двигательной функции (тест ВВВ [Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C., 1995]) в экспериментальных группах показало возможность незначительного улучшения данных показателей после травмы спинного мозга и трансплантации генетически модифицированных Ad5-GDNF клеток микроглии. Иммуногистохимический анализ показал увеличение количества Iba1⁺-клеток в области кортикоспинального тракта у животных с введением клеток микроглии, что подтверждено вестерн-блоттингом. Полученные результаты способствуют дальнейшему углубленному исследованию поведения клеток микроглии в области повреждения.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-4020.2015.7).

**Особенности секреции цитокинов мезенхимальными стволовыми клетками из
головного и костного мозга**

Семочкина Юлия Павловна

Чукалова Айнура Амангельды кызы

НИЦ "Курчатовский институт", Россия, Москва

syomochkina_yp@nrcki.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) стимулируют процессы регенерации при повреждении тканей и органов в значительной степени благодаря широкому спектру цитокинов, которые они секретируют. Совокупность цитокинов, секретируемых МСК, получила название секретома. Впервые МСК были открыты в костном мозге (МСК_{КМ}), а в настоящее время они обнаружены практически во всех тканях. Целью работы явилась характеристика спектра цитокинов, секретируемых МСК_{КМ} и МСК из головного мозга (МСК_{ГМ}).

МСК выделяли из костного и головного мозга мышей линии C57Black/6, культивировали в обычных условиях и характеризовали по набору антигенов с помощью проточной цитометрии, по скорости пролиферации по определению времени удвоения, по способности к дифференцировке, и по способности секретировать различные цитокины. Для анализа уровня секреции цитокинов МСК высаживали в чашки Петри диаметром 6 см в полной культуральной среде ДМЕМ/F12 с 10% фетальной сыворотки в плотности, составляющей 75% от монослоя. Через сутки после прикрепления клеток заменяли полную культуральную среду на 3 мл среды с 5% сыворотки. Кондиционированную среду собирали через 48 часов культивирования. Содержание цитокинов в культуральной среде МСК определяли с помощью иммуноферментного анализа.

Показано, что все МСК экспрессировали антигены Sca-1, CD9, CD140 α , а антигены CD11b и CD45 отсутствовали. Для МСК_{КМ} обнаружены следующие уровни секреции цитокинов: VEGF – 561, G-CSF – 0, HGF – 523, TGF β – 286, IL6 – 112 пг/мл/млн. В случае МСК_{ГМ} уровень секреции цитокинов составил: VEGF – 145, G-CSF – 58, HGF – 2282, TGF β – 409, IL6 – 664 пг/мл/млн клеток. Цитокины IL10 и FGF в среде, кондиционированной МСК_{КМ} и МСК_{ГМ}, выявлены не были.

Таким образом, в случае МСК_{ГМ} обнаружен более высокий, чем для МСК_{КМ} уровень секреции цитокинов IL6, HGF, G-CSF и TGF β , уровень секреции VEGF был более высоким в МСК_{КМ}.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № НК 15-29-01234\15.

**Действие низкодозового синего освещения на митохондрии клеток ретиального
пигментного эпителия японского перепела *Coturnix japonica***

Сережникова Наталья Борисовна^{1,2}, Сигаева Алина Олеговна¹

¹*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва*

²*ФГБУ науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН,
Россия, Москва*

natalia.serj@yandex.ru

Известно, что синий свет при кратковременных мощных экспозициях вызывает повреждения клеток сетчатки и, прежде всего, клеток ретиального пигментного эпителия (РПЭ). Однако данных о влиянии на сетчатку синего света при умеренном повседневном освещении крайне мало. Полагают, что первичными акцепторами действия слабого синего

света в клетках РПЭ являются митохондрии. Поэтому нашей задачей было оценить чувствительность митохондрий РПЭ к действию низкодозового синего света при 2-х режимах освещения. Исследование проведено на японском перепеле *Coturnix japonica*, обладающим небольшой продолжительностью жизни и сходными с человеком морфологическими параметрами сетчатки.

С помощью электронной микроскопии и морфометрического анализа исследовано действие низкодозового (1 Дж/см^2) повседневного и однократного кратковременного (15 минут) освещения синим светом ($\lambda 440\text{--}470 \text{ нм}$) глаз самок *C. Japonica* разного возраста (15, 55, 78 недель). В качестве контрольного освещения использовали эквивалентный по энергии свет обычной лампы накаливания.

Показано, что длительное облучение синим светом, по сравнению с контролем, приводило у 15-недельных птиц к увеличению численной плотности всех митохондрий РПЭ (в 1,5 раза), при этом возрастали число (в 2,5 раза) и удельный объем (в 1,6 раза) митохондрий с увеличенной площадью поверхности – кольцевидных и гантелевидных. У 55-недельных птиц сходные параметры также повышались, но в меньшей степени (в 1,1; 1,8; 1,4 раза соответственно). Даже однократное кратковременное световое воздействие на глаза 78-недельных птиц вызывало небольшое увеличение численности (в 1,2 раза) и удельного объема (1,3 раза) всех митохондрий, но содержание видоизмененных митохондрий не менялось.

Таким образом, оба режима низкодозового синего освещения вызывают увеличение содержания митохондрий в РПЭ птиц всех возрастов. Длительное повседневное освещение повышает и содержание видоизмененных митохондрий, особенно у молодых птиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№14-04-01072 и №15-29-0365).

Возрастные изменения собственной сосудистой оболочки глаза (хориоидеи) японского перепела *Coturnix japonica* в условиях повседневного синего освещения
Сигаева Алина Олеговна, Серезникова Наталья Борисовна
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
aosigaeva@gmail.com

Японский перепел – распространенный модельный объект, использующийся при изучении процессов старения компонентов глаза. В связи с широкой распространенностью источников освещения со спектральным максимумом в области 450 нм и недостаточной изученностью их влияния на состояние зрительной системы человека целью данной работы являлось описание возрастных изменений хориоидеи *Coturnix japonica* в условиях повседневного синего освещения.

В качестве объекта использовались самки японского перепела в возрасте 14, 35 и 55 недель (т.е. молодые, взрослые и пожилые), содержавшиеся при освещении обычной лампой накаливания (контроль) или синим светодиодным источником света ($\lambda=450\text{--}470 \text{ нм}$). Оба вида освещения были выровнены по мощности. Проведен морфометрический анализ хориоидеи на светомикроскопическом и ультраструктурном уровнях с использованием компьютерных программ «ImageJ» и «Statistica 6.0».

Наиболее выраженные изменения морфометрических параметров хориоидеи наблюдались у птиц в возрасте 14 и 52 недель, содержавшихся при синем освещении. Для

14-недельных птиц было характерно повышение пигментированности собственной сосудистой оболочки глаза на 47,8%, а также значительное увеличение доли открытых хориокапилляров (на 63,9%) и капиллярно-сосудистого соотношения (на 60,0%). У 52-недельных птиц наблюдалось утолщение хориоидеи на 12,2%. Удельная доля просветов кровеносных сосудов, доля открытых хориокапилляров и капиллярно-сосудистое соотношение у них было снижено на 39,0%, 26,9% и 27,3% соответственно, тогда как число фенестр в эндотелии хориокапилляров возрастало на 61,4%.

Таким образом, было показано, что повседневное содержание при синем освещении оказывает значительное влияние на состояние хориоидеи *Coturnix japonica*, вызывая как быстро развивающиеся, так и отсроченные изменения ее структуры. Увеличение доли открытых хориокапилляров у молодых птиц может свидетельствовать о возрастающей нагрузке на зрительную систему и вовлечении функционального резерва микрососудистого русла. Структурные изменения в хориоидее старых птиц могут быть вызваны снижением кровотока в собственной сосудистой оболочке, ведущие к адаптивному увеличению проницаемости эндотелия капилляров за счет повышенной фенестрированности. Полученные результаты свидетельствуют о зависимости состояния собственно сосудистой оболочки глаза от спектрального состава повседневного освещения.

Участие факторов STAT1 и STAT5 в регуляции апоптоза нейронов гипоталамуса у трансгенных мышей HER2/neu

Соловьева Анастасия Сергеевна, Прокопенко Полина Игоревна

РГПУ имени Герцена А.И., Россия, Санкт-Петербург

Ansssolo@gmail.com, Prokkopenko@mail.ru

Старение – неотъемлемый биологический процесс, важную роль в котором играет апоптоз. Особенно интересны механизмы возрастзависимого апоптоза нейронов, поскольку эти клетки не способны пролиферировать. В регуляции апоптоза нейронов участвует множество полифункциональных белков, например, белки семейства STAT. Эти белки активируются рецепторами ростовых факторов, в том числе семейством рецепторов HER. Внеклеточный домен HER2, в отличие от других рецепторов семейства, способен без связывания с лигандом образовывать активные комплексы с другими доменами HER2. Подобное свойство упрощает сигнальный путь, давая возможность рецептору активироваться без дополнительных веществ, что может приводить к неконтролируемой передаче сигнала. Цель работы - выявление участия белков STAT1 и STAT5 в регуляции апоптоза нейронов при сверхэкспрессии HER2/neu.

Исследованы HER2-трансгенные ускоренно стареющие мыши разного возраста, дикий тип – линия FVB/N. Оценивали уровень апоптоза нейронов (TUNEL), экспрессию STAT1, 5 (Western blotting) в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса.

В эксперименте уровень STAT1 у молодых мышей FVB/N невысокий. При старении выявлена сверхэкспрессия STAT1 у мышей FVB/N, что коррелирует с повышенным уровнем апоптоза нейронов и говорит о проапоптотической роли STAT1. У молодых мышей HER2 экспрессия STAT1 достаточно высока, и снижается при старении. Уровень апоптоза у трансгенных мышей низкий, как у молодых, так и у старых.

Выявлено, что экспрессия STAT5 примерно одинакова у молодых мышей FBV/N и HER2. При старении у мышей FBV/N наблюдается снижение синтеза STAT5 в обоих нейросекреторных центрах, при повышенном уровне апоптоза. У трансгенных мышей при старении повышается синтез STAT5.

Итак, обнаружено активное участие STAT-сигнального пути в регуляции апоптоза нейронов гипоталамуса при старении. Показано, что супрессия антиапоптотического фактора STAT5 и сверхэкспрессия проапоптотического фактора STAT1 – одна из причин увеличения количества гибнущих нейронов при физиологическом старении. Так как ростовые факторы являются лигандами для STAT-семейства, то сверхэкспрессия рецептора HER2 играет значительную роль в изменении регуляторной направленности STAT-сигналинга. Таким образом, сверхэкспрессия HER2 активирует синтез антиапоптотического STAT5 и супрессирует проапоптотический белок STAT1, что приводит к низкому уровню апоптоза и, далее, способствует канцерогенезу.

Митохондриальный аппарат кардиомиоцитов при инфаркте миокарда

Степанов Андрей Валентинович, Бобков Данила Евгеньевич,

Байдюк Екатерина Викторовна

ФГБУН Институт цитологии РАН, Россия, Санкт-Петербург

botanik2407@gmail.com

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН), развивающаяся вследствие инфаркта миокарда (ИМ), является одной из основных причин смертности во многих странах мира. Данное заболевание характеризуется снижением сократительной активности миокарда, что приводит к состоянию гипоксии во многих тканях и органах. Митохондрии — наиболее чувствительные к гипоксии органеллы клетки. Митохондрии кардиомиоцитов (КМЦ) являются динамическими структурами, способными делиться и сливаться друг с другом, за счет чего происходят изменения строения митохондриального аппарата от единой митохондриальной сети до множества отдельных органелл. Изменение пространственной организации и ультраструктуры митохондрий при патологическом состоянии, в свою очередь, отражает метаболическое состояние клетки.

Работа проводилась на самцах крыс линии Wistar. ИМ был вызван путем перманентного лигирования левой коронарной артерии. Электронно-микроскопическое исследование КМЦ левого желудочка (ЛЖ) сердца крыс было проведено через 6 месяцев после индукции ИМ. Анализ метаболической активности и пространственной организации митохондрий КМЦ проводился на изолированных КМЦ при помощи методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

Исследование выявило значительные изменения митохондриального аппарата КМЦ и ультраструктуры клеток в целом, а также изменение метаболической активности митохондрий КМЦ у экспериментальных животных. Расположение миофибрилл в цитоплазме КМЦ крыс с ХСН отличалось меньшей упорядоченностью. Встречались клетки с деструкцией многих внутриклеточных структур. Особенно сильно эти изменения были выражены в периинфарктной зоне ЛЖ. Объемная плотность митохондрий не различалась во всех экспериментальных группах — митохондрии занимали около 30 % цитоплазмы КМЦ. Количество митохондрий на единицу площади КМЦ также не изменялось, но отношение площади, занимаемой митохондриями, и площади миофибрилл в КМЦ периинфарктной зоны ЛЖ увеличилось на 20,6 % ($p < 0,05$) относительно контроля.

В интактной зоне ЛЖ происходило увеличение средней площади митохондрий на 29,5 % ($p < 0,05$). Плотность упаковки внутренних мембран митохондрий в КМЦ перинфарктной зоны ЛЖ была на 26,3 % ниже ($p < 0,05$), чем в контроле.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном снижении уровня энергетического метаболизма КМЦ ЛЖ крыс с ХСН по сравнению с контрольными животными.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-00730_а.

Элиминация микроядер в клетках культуры MCF-7

Сутягина Оксана Игоревна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

oksanasutyagina@yandex.ru

Лечение онкологических заболеваний часто осуществляется посредством химиотерапии, основанной на применении агентов, вызывающих нарушение формирования веретена деления, образование микроядер (МЯ) и апоптотическую гибель опухолевых клеток (при наличии белка p53). В последнее время в литературе появляются данные о возможности элиминации МЯ, что может способствовать выживанию клеток и опухолевой прогрессии. Целью данной работы является изучение особенностей элиминации МЯ в клетках культуры MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы человека, p53⁺). Образование МЯ индуцировали воздействием паклитаксела (125нМ, 48ч) с последующим удалением агента (24ч). В работе использованы методы световой, иммуно-/цито-флуоресцентной, электронной микроскопии, ПО Vision Bio «West Medica». МЯ присутствуют как в контроле (12±3%), так и при действии паклитаксела (27±5%). Показано существование двух типов МЯ: одиночных мелких (характерны для клеток в контроле) и множественных крупных (возникают при нарушении формирования веретена деления). Для одиночных мелких МЯ показана возможность лизосом-опосредованной деградации, которая усиливается при подавлении апоптотической гибели. Среди крупных множественных выявлены не описанные ранее «вакуолизированные» МЯ (9±1%). Вакуолизация может являться одним из этапов деградации МЯ. Электронномикроскопические исследования выявили МЯ с увеличенным перинуклеарным пространством. Деградация МЯ микроядер может быть также связана с нарушением строения ядерной оболочки. Окрашивание антителами к ламинам A и B1 показало частичное или полное отсутствие ламины в некоторых МЯ. Нарушения ламины чаще обнаруживаются в мелких одиночных МЯ. Ультраструктурный анализ выявил такие дефекты, как слабо выраженный или отсутствующий пристеночный гетерохроматин и единичные или множественные разрывы ядерной оболочки. Кроме того, с наружной мембраной ядерной оболочки могут контактировать мембраны эндосом, что, по данным литературы, может указывать на начальные этапы лизосомной деградации МЯ. В целом, в культуре клеток MCF7 одной клетке могут присутствовать МЯ как нормальной морфологии, так и имеющие признаки разных способов деградации: вакуолизированные МЯ, МЯ с нарушенным строением ядерной оболочки, МЯ колокализированные с лизосомами. Таким образом, клетки культуры MCF7 способны элиминировать отдельные микроядра. Однако, остается не ясным, поможет ли удаление одного или нескольких

микроядер избежать гибели клетки в целом. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00029).

Исследование взаимосвязи между типом клеточной гибели нейтрофилов и развитием аллергического воспаления дыхательных путей

Федорина Анастасия Сергеевна^{1,2}, Сервули Екатерина Александровна²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии

имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

fowlernchips@gmail.com

Нейтрофилы осуществляют неспецифический иммунный ответ организма как на широкий спектр патогенов различной природы, так и на повреждение собственных клеток и тканей. Инактивируя причину воспаления, нейтрофилы погибают апоптозом, что ведет к разрешению воспаления, или же некрозом или нетозом, что усиливает воспалительный ответ. В последнее время, все больший интерес представляет исследование роли нейтрофилов в аллерген-индуцированной сенсибилизации, развитии аллергического воспаления в дыхательных путях и последующем переключении на эозинофил-опосредованную астму. Целью данной работы было оценить способность аллергена индуцировать нетоз или некроз в популяции активированных нейтрофилов костного мозга.

В данном исследовании была использована стандартная модель овальбумин-индуцированного аллергического воспаления дыхательных путей, состоящая из последовательности внутрибрюшинных инъекций и орофарингеального введения аллергена. Нейтрофилы из клеток костного мозга мышей были выделены негативной селекцией при помощи магнитной сепарации и подвергались 4-х часовой инкубации в присутствии активатора – форбол-12-миристат-13-ацетата и аллергена; процент клеток, погибающих некрозом и (или) нетозом определяли путем оценки уровня внеклеточных нуклеотидов.

Активированные нейтрофилы костного мозга преиммунных мышей отвечали дозозависимым повышением уровня внеклеточных нуклеотидов на внесение овальбумина. В концентрации 10 микромоляр овальбумина наблюдали усиление нетоза и (или) некроза, тогда как 1 микромоляр овальбумина не оказывал достоверного влияния. При активации нейтрофилов, выделенных из костного мозга мышей с индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей, наблюдали снижение уровня внеклеточных нуклеотидов по сравнению с уровнем, определяемым в случае нейтрофилов преиммунных животных. В отличие от нейтрофилов интактных мышей, внесение аллергена не оказывало влияние на уровень внеклеточных нуклеотидов в культуре активированных нейтрофилов, выделенных из костного мозга мышей с индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей.

Непосредственное воздействие высоких доз аллергена на активированные нейтрофилы способствует гибели нейтрофилов нетозом и (или) некрозом. При этом, многократное воздействие аллергена на организм, приводит к снижению уровня внеклеточных нуклеотидов в культуре активированных нейтрофилов костного мозга. Наблюдаемый эффект может быть следствием снижения активности нейтрофилов в процессе развития аллергического воспаления дыхательных путей.

**Гистологическая характеристика процесса репаративной регенерации
скелетной мышечной ткани кроликов после механического повреждения**

**Чернова Ольга Николаевна¹, Самчук Денис Петрович²,
Мавликеев Михаил Олегович¹**

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт
фундаментальной медицины и биологии, Россия, Казань*

²*ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой», Москва*

olgachernova92@yandex.ru

Проблема регенерации скелетной мышечной ткани остается актуальной особенно в свете создания и экспериментальной оценки исследования новых способов оптимизации репаративных процессов, в том числе на основе генных и клеточных технологий.

В настоящем исследовании для моделирования и воспроизведения восстановительного процесса кроликам наносили механическое повреждение в виде разреза мышц задних конечностей и их последующего сшивания. Репаративный гистогенез оценивали через 3, 10, 21 сут следующими методами: стандартная гистологическая обработка, окрашивание гематоксилином и эозином, по Маллори, гистоморфометрия.

Гистологические изменения через 3 сут. у животных характеризовались наличием зоны некроза (протяженность $17,9 \pm 4,5$ мкм). Через 10 сут. после повреждения картина в области восстановления мышцы существенно изменена. Процессы альтерации и воспаления уступили место репаративному рабдомиогистогенезу. С обеих сторон от линии разреза регистрируется большое количество миосимпластов и мышечных трубочек. В некоторых полях зрения обнаружены единичные регенерирующие мышечные волокна среди обширных полей соединительной ткани. Через 21 сут. в составе мышечного регенерата превалирует волокнистая соединительная ткань с относительно упорядоченным расположением мощных пучков коллагеновых волокон. В большинстве полей зрения детектируются островковые признаки репаративного рабдомиогистогенеза, о завершенности которого можно будет судить в более поздние периоды.

Таким образом, процессы, наблюдаемые в течение 21 сут. после механического повреждения скелетной мышцы включают в себя закономерную смену этапов альтерации, воспаления, регенерации; процессы ремоделирования мультитканевого регенерата за такой короткий период наблюдений реализоваться не успевают. Данную модель удобно использовать в дальнейших исследованиях в связи с хорошей воспроизводимостью и технической легкостью, а также возможностью объективного морфометрического анализа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00166).

Создание панели изогенных линий клеток, моделирующих болезнь Хантингтона *in vitro*

Шарипова Динара Витальевна¹, Маланханова Т.Б.²

^{1,2}Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,
Россия, Новосибирск

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения РАН», Россия, Новосибирск
dinarizazhiya@yandex.ru, tmalankhanova@gmail.com

Создание клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний является актуальной задачей современной биомедицины в связи с ограниченной доступностью биологического материала для исследований. Болезнь Хантингтона является наследственным заболеванием, вызванным увеличением числа копий триплета CAG в первом экзоне гена *HTT*, что приводит к синтезу мутантного белка хантингтина и гибели нейронов стриатума.

Целью данной работы было получение панели изогенных линий клеток, моделирующих болезнь Хантингтона *in vitro*.

С помощью гомологичной рекомбинации и современной технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 возможно создание изогенных клеточных моделей наследственных заболеваний. Полученные таким образом линии клеток имеют одинаковый генетический фон и отличаются только определенной мутацией, изучаемой исследователем.

Для внесения мутации были использованы плаزمиды рХ458–HTT, кодирующая компоненты системы CRISPR/Cas9, и донорная плаزمиды, несущая 215 повторов CAG, фланкированных плечами гомологии к гену *HTT*. Плазмиды были совместно трансфицированы в эмбриональные фибробласты кожи человека. Плазмиды рХ458–HTT содержит селективный маркер EGFP, который позволяет отсортировать трансфицированные клетки. Сортированные клетки были субклонированы методом рассадки по одной клетке на лунку 96-ячеечного планшета. В результате было получено 32 субклона. С помощью ПЦР анализа было показано, что 2 из 32 субклонов содержат удлиненные тракты тринуклеотидных повторов в гене *HTT*.

Таким образом, были получены две изогенные линии фибробластов, содержащие мутантные аллели гена *HTT*. Эти линии в дальнейшем будут репрограммированы к плюрипотентному состоянию и дифференцированы в нейральные клетки. Полученные нейральные производные могут быть использованы для моделирования болезни Хантингтона *in vitro*, исследования молекулярных механизмов развития заболевания, а также подбора и тестирования лекарственных препаратов.

Работа поддержана Программой РАН «Фундаментальные науки-медицине» № 0324-2015-0021.

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

Базидиальные фитопатогенные макромицеты Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова и Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН: первые шаги в определении биоразнообразия

Антонова Людмила Дмитриевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

lutic-valkiria@yandex.ru

Данная работа является результатом 2,5 лет исследования территории Ботанического сада МГУ (БС МГУ) и начальных этапов исследования территории ГБС им. Н. В. Цицина РАН (ГБС РАН) и представляет собой первый шаг на пути к выявлению биоразнообразия базидиальных макромицетов ботанических садов Москвы. Изучение микобиоты в ботанических садах имеет значение, так как большинство видов грибов тесно связаны с растениями и оказывают на них существенное влияние, являясь микоризообразователями, ксилосапротрофами или ксилопаразитами. Последним следует уделить особое внимание, так как они поселяются в том числе на ценных породах деревьев, не характерных для Московского региона.

Территория БС МГУ обследовалась в течение трех вегетационных сезонов, территория ГБС РАН – в течение одного сезона. Площадь БС МГУ 30 га, из них Дендрарий занимает 10 га. Площадь ГБС РАН 361 га, из них обследованные территории – Дендрарий и участки естественного леса – занимают 150 га. Антропогенная нагрузка практически на все обследованные территории сравнительно невелика. Камеральная обработка образцов заключалась в видовой идентификации собранных образцов на основе макро- и микроскопических признаков.

На данный момент для БС МГУ определено 146 видов базидиальных макромицетов, для ГБС РАН – 50 видов. В БС МГУ большинство видов грибов – 60% – было встречено в Дендрарии. 35% видов были встречены в местах, не приуроченных к конкретному биотопу и, как правило, с наибольшей антропогенной нагрузкой среди всех территорий сада. Из выявленных видов гумусовыми и подстилочными сапротрофами являются 39%, эктомикоризообразователями – 8%, ксилосапротрофами 47% и ксилопаразитами 6% – это 12 видов грибов.

Почти все ксилопаразитические виды макромицетов встречены в БС МГУ. Это *Climacodon septentrionalis* (Fr.) P. Karst., встреченный на *Aesculus hippocastanum*, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, обнаруженный на *Pyrus* sp. и на валеже и пнях *Salix* sp. и, скорее всего, ускоривший гибель деревьев, *Phellinus igniarius* (L.) Quél, собранный на *Salix* sp., *Phellinus rimosus* (Berk.) Pilát., встреченный на *Carpinus* sp. и *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat., обнаруженный на *Larix* sp. В ГБС РАН на *Quercus* sp. часто встречается *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourdot & Galzin. Для остальных встреченных видов грибов показана двойственная сапротрофно-паразитическая стратегия. *Armillaria borealis* Marxm. & Korhonen и *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. обычно трактуются как паразитические виды, редко переходящие на питание отмершим органическим веществом, *Pholiota squarrosa* (Vahl) P. Kumm., *Pholiota squarrosoides* (Peck) Sacc., *Oxyporus populinus* (Schumach.) Donk и *Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar в норме являются

сапротрофами, изредка переходящими к паразитизму. Все виды с двойственной эколого-трофической стратегией обнаружены в обоих ботанических садах.

Почти все выявленные виды грибов были встречены 1-2 раза. Исключение составляют *Armillaria borealis* и *Armillaria mellea*, приуроченные к различным листовным породам и в соответствующий осенний период встречавшиеся на исследуемых территориях повсеместно, особенно в БС МГУ.

Большинство встреченных видов паразитируют на стволе дерева. *Armillaria borealis*, *Armillaria mellea* и *Phaeolus schweinitzii* являются корневыми паразитами.

Столь небольшое количество паразитических грибов может свидетельствовать о неплохом состоянии деревьев в ботанических садах. Тем не менее, на эти находки стоит обратить внимание, так как ксилопаразитные виды грибов представляют определенную опасность для деревьев, на которых они поселяются.

Поиск продуцентов новых нерибосомальных пептидов широкого спектра действия среди представителей рода *Trichoderma*

**Баранова Анна Александровна, Куварица Анастасия Евгеньевна,
Трошина Валерия Алексеевна, Вапнова Сале Руслан кызы**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
имени Г.Ф.Гаузе» РАН, Россия, Москва
anna916184@yandex.ru

Антибиотики продолжают оставаться важнейшими препаратами для лечения инфекционных заболеваний. Возникновение множественной резистентности патогенных грибов и бактерий требует проведения постоянного скрининга новых антибиотиков как направленного, так и широкого спектра действия.

Перспективность получения медицинских препаратов на основе продуцентов рода *Trichoderma* обусловлена длительным их использованием при производстве ферментов, агентов биоконтроля и, соответственно, изученностью условий их промышленного культивирования. Антимикробное действие в отношении грамположительных бактерий, дрожжей и патогенных грибов у представителей рода *Trichoderma* часто связывают с продукцией пептабиолов – мембранно-активных пептидов, содержащих диалкиламинокислоты и аминоспирты.

Целью работы является разработка основ биотехнологии микромицетов рода *Trichoderma* для получения новых антимикробных пептидов с фунгицидной и антибактериальной активностью.

Для культивирования штаммов использовали жидкие среды мальтакс-10, Сабуро и отходы крахмало-паточного цеха ЗАО «Завод премиксов №1». Культуральную жидкость экстрагировали этилацетатом в соотношении 1:2, упаривали в вакууме досуха, затем растворяли в водном растворе этилового спирта (70%). Антибиотическое действие в отношении патогенных грибов и бактерий осуществляли диско-диффузионным методом. Тест-объектами для оценки фунгицидной активности были штаммы патогенных мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов из коллекции ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе» *A. niger* INA 00760 и условно-патогенных микромицетов – 8 видов рода *Aspergillus*: *A. fumigatus* 5К, *A. terreus* 4К, *A. fisheri* 3К, *A. flavus* 7К, *A. nidulans* 8К, *A. ustus* 6К. Спектр антибактериального действия изучали с использованием в качестве тест-культур грамположительных бактерий – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429 и

Staphylococcus aureus FDA 209P. Для фракционирования активного экстракта использовали комбинацию методов жидкостной хроматографии – прямофазной и ОФ-ВЭЖХ.

Первоначально был проведен скрининг 48 изолятов, выделенных из различных экстремальных экониш из коллекций культур ФГБНУ «НИИНА» и кафедр биологии почв и микологии и альгологии МГУ им. М.В.Ломоносова и отобраны 4 активных культуры, активных в отношении условно патогенных микромицетов рода *Aspergillus*.

Подбор условий культивирования для увеличения синтеза антибиотических веществ показал, что максимальной антибиотической активностью, в отношении патогенных и условно патогенных грибов, экстракты культуральной жидкости обладают при комбинировании поверхностного и глубинного способов культивирования штаммов. Штаммы секретировали антибиотические вещества в культуральную жидкость, этанольные экстракты из мицелия были неактивны.

Был отобран штамм *T. citrinoviride*, активный в отношении грамположительных бактерий *S. aureus*, *B. coagulans* 429, а также патогенных видов *C. tropicales* INA 00763 и *A. niger* INA 00760, вызывающих наиболее опасные «госпитальные» инфекции. При проведении последующей ОФ-ВЭЖХ наиболее активной после прямофазной хроматографии фракции №2 смогли получить профиль, состоящий из 32 основных фракций, для 4 из которых была установлена выраженная фунгицидная и/или антибактериальная активность. Выделенные ОФ-ВЭЖХ активные индивидуальные соединения имеют следующие массы: 1109Да, 1569Да, 1675Да, 1720Да, 1800Да. Полученные данные о молекулярной массе веществ и спектра биологической активности позволяют предположить, что выделенные антибиотики относятся к группе мембрано-активных пептидов – пептаиболов согласно имеющейся базе пептидов.

Влияние состава питательного субстрата, условий и продолжительности культивирования на продуктивность, фитотоксическую активность и метаболитные профили экстрактов гриба *Stagonospora cirsii*

Белозерова Мария Юрьевна

*Всероссийский институт защиты растений, Россия, Санкт-Петербург, Пушкин
m-kitty@mail.ru*

Гриб *Stagonospora cirsii* является потенциальным продуцентом биологически активных веществ с гербицидной активностью. Цель работы заключалась в подборе питательных субстратов, условий культивирования, методики экстракции для получения биологически активных веществ нового штамма S-47 гриба *S. cirsii*.

Для культивирования гриба использовали три жидких (среда ДМГ на основе дрожжевого и мальтозного экстрактов, среда Чапека с витаминами – ЧАВ и среда на основе соевой муки – СС) и три твердых питательных субстрата (перловая, пшенная и рисовая крупы). Культивирование *S. cirsii* проводили в течение трех недель (пробы отбирали на второй и третьей неделе культивирования). Экстракцию метаболитов гриба проводили последовательно гексаном, хлористым метилом и этилацетатом. Анализ качественного состава метаболитных комплексов проводили методами ТСХ и ВЭЖХ. Фитотоксическую активность экстрактов оценивали в концентрации 5 мг/мл с использованием высечек из листьев осота и листовых сегментов пырея.

Сроки культивирования значительно влияли на выход экстрактивных веществ (ВЭВ). Вне зависимости от состава субстрата суммарный ВЭВ на второй неделе культивирования гриба был выше, чем на третьей. Максимальный ВЭВ (около 300 мг/л) получен из двухнедельной культуры гриба на среде СС. При твердофазном культивировании максимальный ВЭВ (около 1.5 г/кг) наблюдали через две недели роста гриба на перловой крупе.

При проявлении хроматограмм, полученных при помощи ТСХ в системе гексан – этилацетат 1:1, реагентом на основе серной кислоты выявлено значительно больше соединений, чем при их детектировании при 254 нм. Метод ВЭЖХ/УФ подтвердил, существенные различия в качественном составе метаболитных комплексов, выделенных из колонизированных грибом жидких и зерновых субстратов.

Относительно высокую фитотоксическую активность проявил гексановый экстракт из культуры *S. cirsii*, полученной на пшене, вне зависимости от сроков ферментации. Осот оказался более чувствительным к действию экстрактов из твердофазных культур гриба, чем пырей. Экстракты из культурального фильтрата гриба, выращенного на жидкой среде СС, также были более фитотоксичны в отношении осота, чем пырея. Напротив, экзометаболиты, извлеченные из культурального фильтрата *S. cirsii*, выращенного на жидких средах ЧАВ и ДМГ, специфичности к осоту не проявили.

Таким образом, для выявления максимального разнообразия фитотоксинов *S. cirsii* в дальнейшем гриб необходимо культивировать 2 недели как на жидких, так и твердых субстратах.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-16-00085.

**Видовое разнообразие миксомицетов Звенигородской биологической станции
МГУ имени М.В.Ломоносова в 2015 году**
**Беляева Мария Олеговна, Закиров Амир Наилевич, Русанова Валерия Руслановна,
Сучалко Олег Николаевич, Филиппова Анна Александровна,
Хитяева Вероника Владимировна, Шмитко Анна Олеговна,
Юзефович Александр Павлович**
МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва
belyaevamary@rambler.ru

Класс Мухомycetes, или неклеточные слизевики, – одна из интереснейших групп наземных организмов, сочетающих в себе признаки животных и грибов. В рамках студенческих самостоятельных работ на Звенигородской биологической станции имени С.Н.Скадовского биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (ЗБС) осуществляется ежегодный мониторинг видового разнообразия и таксономической структуры представителей класса Мухомycetes.

Сбор спороношений производили с 20.07.2015 по 22.07.2015. Образцы собирали с лиственных и хвойных пород деревьев, валежа и листового опада в орешниковом ельнике, бересклетовом ельнике, облесённом овраге на террасном склоне и елово-берёзовом лесу. Из образцов со сформировавшимися спорофорами изготавливали временные препараты в 3% растворе КОН. Незрелые спороношения помещали под стеклянный колпак на влажную фильтровальную бумагу до созревания. Определение производили по Определителю миксомицетов Московской области (Гмошинский и др., 2015) и (Martin, Alexopoulos, 1969).

Всего было собрано 296 образцов спороношений миксомицетов, относящихся к 55 видам, 22 родам, 8 семействам и 5 порядкам, из них 3 вида – *Dictydiaethalium plumbeum*, *Craterium leucocephalum* и *Didymium clavus* – являлись редкими для ЗБС МГУ, и один образец (*Physarum* sp.) не был определён до вида.

Наибольшей видовой насыщенностью (доля видов порядка, отнесённая к общему числу видов) обладали пор. Physarales (20 видов), содержащий 2 семейства: Physaraceae (16 видов) и Didymiaceae (4 вида), и пор. Trichiales (16 видов), представленный двумя семействами: Arcygiaceae (9 видов) и Trichiaceae (7 видов). Пор. Liceales был представлен 11 видами в двух семействах: Cribrariaceae (6 видов) и Reticulariaceae (5 видов). К пор. Stemonitales с единственным семейством Stemonitidaceae относилось 7 видов. Пор. Ceratomyxales был представлен одним видом – *Ceratomyxa fruticulosa*, встречаемом в двух разновидностях: var. *porioides* и var. *flexuosa*.

Анализ данных 7 работ за прошедшие 6 лет показывает, что, согласно значениям коэффициентов Сёренсена-Чекановского, видовое разнообразие миксомицетов в 2015 г. было наиболее близко к 2012 г. Это можно объяснить сходными погодными условиями ($t^{\circ}=15-20^{\circ}\text{C}$; короткие обильные осадки). Списки видов в 2010 и июле 2011 г. достаточно похожи, что, возможно, объясняется повышенной влажностью и температурой, которые наблюдались в эти годы. Значения коэффициента Сёренсена-Чекановского при попарном сравнении оказались сравнительно низкими для 2014 (список видов в значительной степени отличался от списков видов других годов), что, вероятно, объясняется довольно высокой температурой и продолжительной засухой.

Микромицеты в авиационном топливе

Бобырева Татьяна Викторовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

bobtana25@gmail.com

Различные нефтепродукты, включая авиационные топлива (АТ), могут быть подвержены биоповреждениям, особенно под воздействием микроскопических грибов. Развиваясь в топливе, микромицеты могут быть причиной сбоев в работе авиационной техники. В связи с этим изучение организмов, растущих в АТ, весьма актуально. Цель работы – выявить грибы, способные поражать АТ.

ФГУП «ВИАМ» были предоставлены две пробы топлива ТС-1 после экспонирования на микологической площадке в Сочи в течение года. В пробах отмечалось наличие хлопьевидных образований. Главным отличием было присутствие во второй противоизносной присадки. Выделение микромицетов проводилось методами прямого посева и серийных разведений на сусло-агар. Впоследствии путем инокуляции стерильного топлива они были проверены на способность роста в АТ.

Из первой пробы были выделены: *Cadophora melinii*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium thomii*, *Phialemonium artrogriseum*. Из второй: *Exophiala* sp., *Penicillium brevicompactum* и *Talaromyces rugulosus*. Из них только два оказались способны расти в стерильном топливе – *P. artrogriseum* и *P. variotii*. Первый давал пленку темно-серого цвета на границе раздела топлива и водно-минерального слоя, помутнение среды и образовывал мицелиальные сгустки. Спустя год в топливе был обнаружен хорошо развитый мицелий со вздутиями и отростками, но без спороношения. Второй гриб образовывал сгустки и лентовидные хлопья белого цвета. Микроскопирование через год

показало наличие спороношения, причем размер и толщина стенки конидий были больше таковых на обычных средах. На этом основании оба вида отнесены к группе потенциальных деструкторов.

Остальные изоляты через год не дали роста, поэтому были отнесены к группе частично адаптированных или случайных микромицетов. Некоторые из них по данным литературы являются деструкторами нефтепродуктов. Отсутствие роста в данном эксперименте объясняется тем, что по способности усваивать различные углеводороды могут отличаться даже близкие штаммы одного вида, выделенные в одинаковых условиях.

Итак, в работе показано, что не все микромицеты, выделенные из АТ, способны расти в нем и проходить все стадии развития. Соответственно, одни могут стать потенциальными деструкторами топлива, а другие – быть только частично адаптированными к среде или вовсе быть случайными.

Морфологические особенности репродуктивных органов фукусовых водорослей

Брокарева Евгения Андреевна

Мурманский государственный гуманитарный университет, Россия, Мурманск

shiperova.ewgenia@yandex.ru

Морские макрофиты – группа фотосинтезирующих растений, значение которых трудно переоценить для морских экосистем и для биосферы в целом. Физиология, морфология вегетативных тканей, биогеография фукусовых водорослей изучены достаточно подробно, однако, сведения о репродукции немногочисленны и имеются лишь для нескольких видов. Целью нашего исследования явилось изучение особенностей морфологии репродуктивных органов у литоральных водорослей *Fucus vesiculosus* L. и *Ascophyllum nodosum* (L.) *Le Jolis* (*Phaeophyta*).

Сбор материала осуществлялся круглый год на литорали в губе Зеленецкая, бухте Прибойная, г. Териберская (Восточный Мурман), а также в южном колене Кольского залива (район пос. Абрам-мыс). Для гистологических и цитологических исследований отбирали высечки рецептакулов *F. serratus* и *A. nodosum*. Полутонкие (1-2 мкм) и ультратонкие (20-30 нм) срезы получали стеклянными ножами на ультрамикротоме Reichert UM-2.

Согласно данным В.В. Кузнецова (1960, 1962), Е.В. Шошиной (2003) развитие и созревание рецептакул у фукоидов в Баренцевом и Белом морях идет в течение длительного периода – от 5 до 12 месяцев. Однако эти авторы отмечают, что закладка рецептакулов у *F. vesiculosus* начинается в октябре, а в январе завершается их развитие, и формируются гаметангии, массовый выход гамет в июне, рецептакулы могут встречаться на растениях до августа – сентября. По нашим данным, на побережье Восточного Мурмана закладка рецептакулов происходит в период полярной ночи – декабрь, к марту завершается их развитие, и формируются гаметангии, половая зрелость достигается к июню, массовый выход гамет в июле-августе, рецептакулы могут встречаться на растениях до сентября. В районе Западного Мурмана рецептакулы сохраняются до начала октября. В зависимости от места произрастания сроки созревания могут изменяться.

Ранее (Петров, 1974) было показано, что морфофизиологические характеристики фукусов в значительной мере зависят от интенсивности движения воды. При изучении ростовых процессов у *F. vesiculosus* Белого моря выявлено, что волновая гидродинамика и скорость течения оказывают влияние на эти параметры (Терехова, 1972). Результаты

наших исследований показывают, что в зависимости от места произрастания изменяются средние размеры оогониев в рецептакулах. В условиях открытого побережья высокая интенсивность движения воды подавляет развитие оогониев (замедляет сроки созревания, вызывает формирование более мелких оогониев). В кутовых участках обычно интенсивность движения воды незначительна (4-5), однако отмечается присутствие рек, ручьев, которые вызывают понижение солености воды. На этих участках развитие рецептакулов подавляется снижением солености.

Закладка репродуктивных органов у фукуса пузырчатого, произрастающего на литорали Восточного Мурмана, происходит в декабре (период полярной ночи). В апреле-мае завершается их развитие, и формируются гаметангии, массовый выход гамет в июле-августе.

Соленость и интенсивность движения воды влияют на развитие рецептакулов. В условиях низкой ИДВ и пониженной солености (25-30‰) размеры оогониев уменьшаются. Высокая ИДВ также снижает размеры оогониев.

Оптимальными для развития рецептакулов являются степень прибойности 2-3 и морская соленость воды (32‰), тогда размеры рецептакулов наибольшие.

Основной этап формирования репродуктивных органов у *A. nodosum* происходит в период конца июня – начала и середины июля, массовый выход гамет в августе и характеризуется максимальной скоростью, процесс осуществляется за 3-4 дня.

Мучнисторосяные грибы Ботанического сада МГУ на Воробьевых горах

Ветрова Мария Алексеевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
cheetarki@mail.ru*

Мучнисторосяные грибы – обширная группа паразитических организмов, играющая значительную роль в хозяйственной деятельности человека. В городе растения имеют большое значение, однако воздействие негативных факторов делают их уязвимыми для фитопатогенов. Ботанические сады являются хорошей моделью для изучения взаимодействия паразитических грибов и растений в городских условиях. Целью моей работы было выявление видового состава и биологических особенностей мучнисторосяных грибов, паразитирующих на различных растениях Ботанического сада МГУ на Воробьевых горах.

В течение 2013 – 2015 гг. с мая-июня по октябрь маршрутным методом проводили сбор пораженных частей растений в Ботаническом саду МГУ на Воробьевых горах (Москва), отмечая каждое зараженное растение на карте с помощью GPS-навигатора или вручную. Полученные образцы гербаризировали для последующего хранения, а также обрабатывали глутаровым альдегидом для последующего просмотра на СЭМ. Далее проводили идентификацию грибов с помощью методов световой и электронной микроскопии. В результате за 2013-2015 гг. было собрано 433 образца, пораженных мучнисторосяными грибами, а за все время наблюдений отмечено 776 случаев заражения.

В ходе работы идентифицировано 70 видов мучнисторосяных грибов, относящихся к 7 родам, и 141 вид растений, относящихся к 99 родам. Среди растений наиболее многочисленны представители семейств Сложноцветные (27 видов) и Розоцветные (16 видов), наименее – Крушиновые, Сумаховые, Норичниковые, Крапивные, Синюховые и Коноплевые. Самыми уязвимыми для мучнисторосяных грибов являются представители

семейств Розоцветные, Сложноцветные и Сапиндовые, самыми устойчивыми — Кизиловые, Сумаховые, Фиалковые. Наиболее широко представлен род *Erysiphe* (32 вида), а наименее — роды *Microsphaera*, *Neoerysiphe*, *Phyllactinia* и *Sawadaea*, включающие по одному виду. Согласно полученным данным, наиболее распространенными видами мучнисторосяных грибов являются *Erysiphe berberidis* DC. (47 точек) и *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. (38 точек), отмеченные на всей территории Ботанического сада в течение всего лета. 11 видов мучнисторосяных грибов отмечены единично.

Таким образом, изучен видовой состав мучнисторосяных грибов, поражающих растения Ботанического сада МГУ на Воробьевых горах, получены данные о фенологии и особенностях развития. Это позволит разработать более эффективные методы борьбы с мучнисторосяными грибами.

Рекомбинационное клонирование генов биосинтеза и транспорта цефалоспорина С в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Витнова Наталья Андреевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

natasha.vytnova@yandex.ru

Дрожжи-сахаромицеты являются одними из наиболее изученных эукариотических организмов. Интересным приложением метаболической инженерии дрожжей является реконструкция в клетках этих микроорганизмов путей биосинтеза бета-лактамных антибиотиков – пенициллинов и цефалоспоринов. Разработка систем продукции бета-лактамных антибиотиков в дрожжах могла бы оказаться полезной для разработки более эффективных производственных процессов, для идентификации и изучения свойств белков биосинтеза и транспорта пенициллинов и цефалоспоринов, получения *in vivo* различных производных антибиотиков.

Цель данной работы – конструирование методами гомологичной рекомбинации в дрожжах многокомпонентного вектора, способного обеспечивать отдельные этапы биосинтеза и транспорта антибиотика цефалоспорина С в *Saccharomyces cerevisiae*.

В работе использовались стандартные молекулярно-генетические методы: ПЦР, ДНК-манипуляции (выделение плазмидной ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции), а также трансформация дрожжей и клеток *Escherichia coli*.

С помощью TAR-клонирования в дрожжах была осуществлена одностадийная сборка мультикомпонентной плазмиды для экспрессии генов *cefEF* и *cefT* *Acromonium chrysogenum*. *CefEF* кодирует экспандазу – фермент, катализирующий предпоследнюю стадию биосинтеза цефалоспорина С, *cefT* – мембранный транспортер, отвечающий за экспорт цефалоспорина С. Для снижения числа артефактов сборка вектора pNV проводилась по принципу разделения элементов плазмидной селекции и репликации. Были получены ПЦР фрагменты, кодирующие кассету экспрессии гена *CefT*, ген *CefEF*, промотор *GAL1*, *ARS1* и *HIS3* – элементы и вектор pVC604 с перекрывающимися участками гомологии размером 60-65 пн. Ко-трансформация дрожжей 6-ю ПЦР-фрагментами приводила к образованию значительного числа трансформантов, большинство из которых по данным ПЦР-анализа несли искомые гены *CefEF* и *CefT*. Несколько плазмид были выделены из дрожжей и перетрансформированы в клетки *E. coli*. Анализ выделенных из клеток *E. coli* плазмид с помощью ПЦР, расщепления

рестриктазами и секвенирования подтвердил их идентичность спроектированной конструкции.

Таким образом, подтверждена эффективность TAR-клонирования в дрожжах с разделением элементов «выживания плазмиды» для мультифрагментной сборки челночных плазмид в дрожжах. Методом TAR-клонирования получена плазида рNV для переноса и экспрессии генов биосинтеза и транспорта цефалоспоринов С в дрожжах *S. cerevisiae*. Правильность сборки плазмиды подтверждена ПЦР, рестрикционным анализом и секвенированием.

Развитие мучнисторосяных грибов в городских условиях

Головина Екатерина Дмитриевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

katjaramm@yandex.ru

Мучнисторосяные, или эризифовые, грибы представляют собой группу облигатных паразитов сосудистых растений, вызывающих заболевание, называемое «мучнистой росой». Мучнистая роса встречается на представителях практически всех семейств двудольных растений, нанося существенный вред многим культурным видам. При этом достаточно мало работ, изучающих развитие мучнисторосяных на дикорастущих растениях, и целью данного исследования является изучение развития мучнисторосяных грибов, как на сорных, так и на саженных растениях в условиях города.

Работа была выполнена в г. Москва на территории районов Раменки и Гагаринского. В период с 18 августа по 6 октября 2015 года проводилось маршрутное обследование территории, сбор материала и гербаризация. Для произрастающих на обследованной территории кленов сделаны количественные учеты поражения, путем определения процента пораженной площади листа в программе Adobe Photoshop CS. Определение видового состава проводилось по гербарному материалу.

Заболевание обнаружено на 54 видах растений из 24 семейств, среди которых преобладают представители семейства сложноцветных. Большая часть поражаемых растений являются травянистыми, на деревьях и кустарниках обнаружено 10 и 15 видов соответственно.

Всего было выявлено 32 вида эризифовых грибов, относящихся к пяти родам: *Erysiphe* (15 видов), *Golovinomyces* (9), *Podosphaera* (6), *Sawadaea* (1) и *Phyllactinia* (1). Самыми распространёнными на исследуемой территории являются *Golovinomyces sonchicola* U. Braun et R.T.A. Cook, *G. sordidus* (L. Junell.) V.P. Heluta) и *G. cichoracearum* (DC.) Heluta). Единично встречались такие виды как *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lév. и *Erysiphe penicillata* (Wallr.) Link. У большинства выявленных эризифовых наблюдается чёткая приуроченность к одному виду растения-хозяина. Было обнаружено только два патогена, которые поражали разные виды хозяев – *Erysiphe polygoni* DC. и *Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun et Shishkoff.

По картам, составленным на основании полученных данных, заметны очаги развития мучнистой росы клена. В среднем большая интенсивность поражения наблюдается у клёнов, растущих вдоль Университетского проспекта на Большом газоне МГУ. Во дворах и на Воробьёвых горах распределение сильно и слабо поражённых деревьев довольно неравномерное, что может быть связано с большей гетерогенностью среды данных местообитаний.

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* демонстрируют некоторые элементы перекрестной адаптации при воздействии теплового и pH-стрессов

Дергачева Дарья Игоревна^{1,2}, Секова Варвара Юрьевна¹

¹ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова», Россия, Москва
ddarya1993@gmail.com

Явление перекрестной (кросс-) адаптации – усиление устойчивости организма к одному виду стресса после предварительной обработки нелетальной дозой другого – представляет интерес для современной биотехнологии, так как позволяет создавать в промышленных условиях конкурентоспособные сообщества микроорганизмов и моделировать биохимические пути синтеза целевых компонентов.

В данной работе явление кросс-адаптации изучалось на модели полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica*, при их культивировании на жидкой среде YNB; в качестве стрессовых факторов использовались повышенное значение pH среды – 9.0 (оптимальное значение – 5.5) и повышенная температура – 37°C (оптимальное значение – 28°C). В качестве контроля использовали клетки, выращенные в оптимальных условиях. В ходе работы была проанализирована кинетика роста *Y. lipolytica*, выживаемость и морфологические изменения клеток при воздействии стрессоров. Кроме того, были изучены активности ключевых антиоксидантных ферментов клетки – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также оценена дыхательная активность полярографическим методом.

Исследование закономерностей роста культуры *Y. lipolytica* показало, что, в отличие от роста при нормальной температуре, логарифмическая стадия роста при 37°C длилась примерно 30-35 ч. против 18-20, при этом первые 15 ч. культивирования наблюдалось активное деление клеток, а затем происходило замедление скорости роста. В культурах, выращенных при комбинировании двух стрессовых факторов, микроскопирование культуры показало формирование сферических пеллет слоистой структуры.

Анализ активности антиоксидантных ферментов клетки показал увеличение активности СОД примерно в 20 раз, а каталазы – примерно в 5 раз по сравнению с контролем. Электрофоретические профили активности СОД продемонстрировали появление двух дополнительных полос, обладающих СОД-активностью, одна из которых находилась в низкомолекулярной зоне. Исследование дыхательной активности клеток показало, что при единичном стрессовом воздействии (pH 9,0 либо повышенная температура) индуцируется альтернативная оксидаза митохондрий.

Исследование выживаемости клеток методом Коха (высева суспензии клеток на плотную среду) показало, что наибольшей способностью к колониеобразованию обладают клетки, подвергнутые воздействию повышенной температуры и pH одновременно. Необходимо подчеркнуть, что все маркеры стресса (индукция альтернативной оксидазы митохондрий, сравнительно низкая выживаемость) в клетках, выращенных при повышенной температуре и pH 5,5, были более выражены, чем в клетках, выращенных при повышенной температуре и pH 9,0.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что при воздействии на дрожжи *Y. lipolytica* двух стрессовых факторов (повышенной температуры

и щелочных рН среды культивирования) происходит характерное для перекрестной адаптации изменение морфологии клеточной культуры и повышение выживаемости клеток до 100%.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00-634 мол_а.

***Nodosilinea epilithica* — новый для флоры России вид цианобактерий
Дронова София Алексеевна², Темралева Анна Дисенгалиевна^{1,2}**

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
Россия, Пуццино

²Пуццинский государственный естественно-научный институт, Россия, Пуццино
sonja.dronova@gmail.com

На основании морфологического и молекулярно-генетического анализов род цианобактерий *Nodosilinea* (Leptolyngbyaceae, Synechococcales) был выделен из полифилетичного рода *Leptolyngbya* в 2011 г. На территории России находки данного таксона представлены *N. bijugata* (Kongisser) Perkinson, Kovácik (как *Phormidium bijugatum* Kongisser), обнаруженной в различных водных и наземных биотопах, а также *N. sp.* из Кулундинских степных содовых озер. Вид *N. epilithica* Perkinson, Casamatta, штамм которого был изолирован нами из каштановой почвы Волгоградской области, приводится впервые для почвенной альгофлоры России.

Для идентификации цианобактериального штамма использовали методы световой микроскопии и 16S рРНК-анализ. Исследованный штамм характеризовался следующими морфологическими признаками: частое образование узелков; длинные нити (прямые одиночные или скрученные в виде жгутов); отсутствие ветвления; открытые тонкие бесцветные чехлы; перешнурованные трихомы 1.5–2.0 мкм шириной; отсутствие некрических клеток и меристематических зон; размножение гормогониями; клетки бочковидные до 3.0 мкм длиной, часто с 1 или 2 гранулами у поперечных перегородок; терминальная клетка закругленная. Таким образом, по морфологии исследованная цианобактерия была идентифицирована как *N. epilithica*. Сравнительный молекулярно-генетический анализ на основе последовательностей гена 16S рРНК подтвердил предварительный морфологический диагноз: внутри клады *Nodosilinea* штамм устойчиво кластеризовался с *N. epilithica* Kovácik 1998/7. Генетические различия между диким и аутентичным штаммами составили всего 0.4 %, в то время как с другими видами *Nodosilinea* — от 1.1 до 3.9 %. Интересной особенностью исследуемой цианобактерии являлась способность образовывать узелки в стандартных световых условиях (60–75 мкмоль•м⁻²•с⁻¹), в то время как ранее описанные штаммы *Nodosilinea* формировали узелки при низкой освещенности: 4–6 мкмоль•м⁻²•с⁻¹ и ниже. Тем не менее, по нашим наблюдениям количество узелков связано не с уровнем освещенности, а с возрастом цианобактериальной культуры. Так, узелки встречались единично в молодой 2-х недельной культуре, но их количество значительно увеличивалось в старой культуре (3 месяца и более). И хотя точная функция данных структур до сих пор не установлена, есть предположение об их участии в азотфиксации, что требует дальнейшего подтверждения. Таким образом, впервые на территории России была обнаружена цианобактерия *N. epilithica*, подтвержденная морфологическим и молекулярно-генетическим анализом.

Изученный штамм был депонирован в Альгологическую коллекцию ACSSI под номером 34.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-60020 мол_а_дк.

Определение устойчивости различных марок бетона к биоповреждениям

Зайнуллина Айгуль Рамисовна, Яковлева Галина Юрьевна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

aigul.zainullina@bk.ru

Микроорганизмы, а также мхи, лишайники и другие организмы являются важными биодеструкторами, разрушающими бетон. Продукты метаболизма плесневых грибов (ряд карбоновых кислот) негативно влияют на строительные материалы. Цель работы – оценка устойчивости различных марок бетона к воздействию плесневых грибов.

В работе использовались образцы строительных материалов на основе портландцементов М400 и М500, моделирующих мелкозернистый бетон, предоставленные кафедрой химии и инженерной экологии в строительстве Казанского государственного архитектурно-строительного университета, в качестве тест-культур – *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma sp.* Обработку бетонных блоков проводили двумя методами: «вода + споры микромицетов» (1) и «среда Чапека-Докса + споры микромицетов» (2). В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду. Культивирование проводили на протяжении 28 суток при температуре 30°C. Биостойкость бетонных блоков определяли по коэффициенту химической стойкости (ГОСТ 310.4-81), который характеризует изменение прочностных характеристик образцов после испытания их на прочность при изгибе и сжатии до и после экспозиции. Определение органических кислот, образующихся при культивировании микромицетов проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Flexar (Perkin Elmer, США). Для этого споры засеивали в жидкую среду Чапека-Докса и культивировали в стационарных условиях 28 суток при температуре 30°C.

После 28 суток контакта с микромицетами значения коэффициентов химической стойкости образцов снизились не более чем на 1–3%, что свидетельствует об отсутствии достоверных изменений. При внешнем осмотре образцов после 28 суток инкубации не отмечался рост микромицетов на поверхности бетонных балок, при анализе смывов с поверхности образцов количество проросших на твердой питательной среде Чапека-Докса спор в пересчете на 1 см² образца в варианте 2 в среднем 5 и 25 раз превышало их количества в варианте 1 и контроле, соответственно. Качественный анализ микромицетов показал преобладание видов *A. niger* и *A. pullulans*, что, возможно, связано с более низкой скоростью роста *Trichoderma sp.* Низкая же интенсивность развития микромицетов на поверхности предложенных для исследования блоков, вероятнее всего, связана с высоким рН образцов, так как известно, что оптимальный для роста микромицетов рН находится в кислой области.

При анализе образовавшихся органических кислот в процессе культивирования выбранных микромицетов на жидкой среде Чапека-Докса было показано, что все микромицеты активно синтезируют щавелевую кислоту. Наибольшая ее концентрация отмечалась в культуральной жидкости *Trichoderma sp.*, что в 2 и 3 раза превышает количество щавелевой кислоты в культуральной жидкости *A. niger* и *A. pullulans*,

соответственно. Кроме щавелевой кислоты у *Trichoderma sp.* фиксировали незначительное количество лимонной кислоты, а у *A. niger* и *A. pullulans* – яблочной.

Несмотря на то, что изменения прочностных характеристик образцов минеральных строительных материалов обнаружено не было, высокая скорость роста микромицетов и образование органических кислот в процессе их роста свидетельствует о том, что более длительный контакт микроскопических грибов со строительными материалами может привести к их значительным повреждениям.

Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия — эффективный метод визуализации резервов фосфора в клетках зеленых микроводорослей

Исмагулова Татьяна Талгатовна, Шебанова Анастасия Сергеевна
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
ismagulova.t@gmail.com

В отсутствие дефицита фосфора (P) зеленые микроводоросли накапливают в вакуолях высокое количество неорганического P, в том числе в виде полифосфатных (PolyP) включений. Однако механизмы и регуляция накопления PolyP в клетках микроводорослей до конца не ясны. Расшифровка этих механизмов дала бы ценные новые знания о физиологии фототрофных организмов в средах, богатых P. Такие знания необходимы, в частности, для разработки эффективных биотехнологий изъятия P из сточных вод с помощью микроводорослей и для решения глобальной проблемы дефицита P.

Изучали вакуолярные включения в клетках пяти штаммов зеленых микроводорослей: *Chlorella vulgaris* CCALA 256, *Parachlorella kessleri* CCALA 251, *C. vulgaris* IPPAS C-1, *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014 (3Dp86E-1) и *Acutodesmus obliquus* 46 (GenBank ID KP203852) со стационарной фазы роста на среде BG-11 (*Desmodesmus sp.* и *A. obliquus*) и Tamiya (*C. vulgaris* CCALA 256, *P. kessleri* CCALA 251 и *C. vulgaris* IPPAS C-1). Образцы для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) готовили по стандартному протоколу с применением фиксации глутаровым альдегидом и четырехокисью осмия, обезвоживания в этаноле и заключения в аралдит. Срезы анализировали на микроскопе JEM2100 (JEOL, Япония) с катодом из LaB₆, оснащённым детектором для сканирующей ПЭМ (СПЭМ), рентгеновским детектором X-Max (Oxford Instruments, Великобритания) и энергетическим фильтром GIF Quantum ER (Gatan, США). Для контроля локализации включений внутри среза и исключения регистрации артефактов использовали метод электронной томографии. Присутствие PolyP в клетках подтверждали при помощи ЯМР-спектроскопии ³¹P (в сотрудничестве с В.И. Польшаковым, факультет фундаментальной медицины МГУ, и С. Dijkema, Wageningen University, the Netherlands).

Показана применимость метода аналитической ПЭМ для исследования резервов P в клетках микроводорослей. Метод позволяет оценить наличие различных вакуолярных PolyP-включений в клетках с высокой чувствительностью и высоким пространственным разрешением, недостижимым при использовании других методов. Полученные результаты и разработанные протоколы могут быть использованы для изучения влияния условий культивирования на метаболизм PolyP. Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) было показано, что основные внутриклеточные резервы P всех изученных микроводорослей содержались в вакуолях. PolyP-включения

были гетерогенны как по элементным спектрам, так и по ультраструктуре. Методами ЭДС, спектроскопии характеристических потерь энергии электронов и энергофильтрующей ПЭМ установлено, что у *Desmodesmus* sp. и *A. obliquus* вакуоли могут быть запасующим компартментом не только для P-, но и для азотсодержащих соединений. Для поиска связей между выявленной картиной распределения, динамикой содержания PolyP-включений и метаболизмом PolyP необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена в сотрудничестве с коллегами кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-54-06004) и РНФ (проект 14-50-00029).

К выявлению хориономических элементов лишенофильной микобиоты Кавказа

Кобзева Анастасия Андреевна

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

anastasiakobzeva9023@gmail.com

Лишенофильные грибы – это эколого-трофическая группа паразитов лишайников, представители которой обнаружены во всех частях света. Традиционно они описываются и анализируются вместе с лишайниками-хозяевами, поэтому при изучении их распространения целесообразно использовать одну из систем флористического районирования, используемых для лишайников – все они представляют собой модифицированную систему А. Л. Тахтаджяна (1986), но с более крупными флористическими выделами. Выделение географических элементов представляет один из важных этапов выявления географической структуры биоты. Учитывая фрагментарную изученность лишенофильной микобиоты в мире, были выбраны методы, позволяющие выделить общие географические элементы на уровне глобальных планетарных выделов.

На данный момент флористический список лишенофильных грибов Кавказа насчитывает 191 вид, преимущественно из Кавказского и Тебердинского заповедников. 16 % из них были отмечены впервые для России и 14 % являются новыми для Азии. В анализ было включено 68 видов – в основном это виды, новые для Кавказа. Была использована система глобальных фитохорий Фюрера и Хоуксворса (2007). Распространение 44 % кавказских видов (24 вида из 68) выходит за пределы Голарктической фитохории. 16 видов (23, 5 %) отмечено в Голарктической и Австрало-Субантарктической, 8 видов – в Голарктической и Пантропической фитохориях. 5 видов встречается в Голарктической, Пантропической и Австралийско-Субантарктической фитохориях. Вид *Biatoropsis usnearum* Räsänen отмечен во всех фитохориях: Голарктической, Пантропической, Австралийско-Субантарктической и Океанической.

Кроме того, для более точной характеристики возможного ареала был использован метод Л. Г. Бязрова (2013). Метод предполагает составление формулы ареала для каждого вида, которая состоит из указания биогеографической области и биома и привязку к общемировой карте экорегионов суши (2001). Так, виды широко распространенного и хорошо заметного рода *Abrothallus* De Not. отмечены в Палеарктической, Неарктической, Неотропической и Австралоазиатской областях. Показано присутствие всех «кавказских» видов в биомах 04 («умеренные широколиственные и смешанные леса») и 12 («средиземноморские леса, редколесья и кустарники») Палеарктической области (РА04, РА12), а также в биомах 04 Неарктической области (НА04).

Таким образом, можно предполагать наличие видов с космополитическим распространением (*Biatoropsis usnearum* Räsänen, *Diplotomma nivale* (Bagl. & Carestia) Hafellner, *Lichenostigma cosmopolites* Hafellner & Calat., *Milospium graphideorum* (Nyl.) D.Hawksw., *Perigrapha superveniens* (Nyl.) Hafellner, *Tetramelas pulverulentus* (Anzi) A. Nordin & Tibell), однако, следует помнить, что морфологический вид может включать в себя криптические виды, ареалы которых более узкие. На данный момент сведений о распространении лихенофильных грибов на земном шаре недостаточно, однако они постоянно пополняются. Карты с указанием формулы ареала позволяют удобно вносить новые сведения, дополнять и уточнять понимание об ареале каждого вида.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01031 «Лихенофильные грибы Северо-Западного Кавказа».

Изучение штаммов домовых грибов из коллекции культур базидиомицетов LE-BIN

Колкер Татьяна Леонидовна

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

tanea.kl@mail.ru

Домовые грибы способны разрушать деловую древесину в условиях повышенного увлажнения. Изучение свойств этих грибов открывает возможности для разработки мер борьбы с ними.

В коллекции культур базидиальных грибов БИН РАН (LE-BIN) хранятся штаммы домовых грибов, которые были отобраны для исследования. Их идентификация проводилась ранее по морфологическим признакам. В связи с этим перед нами была поставлена задача верификации штаммов домовых грибов с использованием молекулярных методов, а также изучения их культурально-морфологических особенностей.

Для исследования было отобрано 25 штаммов домовых грибов из родов: *Serpula*, *Phlebiopsis*, *Antrodia*, *Neolentinus*, *Coniophora*, *Gloeophyllum*.

Анализ морфологических особенностей штаммов домовых грибов показал значительную вариабельность текстуры и окраса колоний, гифальной системы и микропризнаков, варьирующих даже в пределах штаммов одного вида. Вышеупомянутые особенности натолкнули на необходимость проведения молекулярного исследования для подтверждения таксономической принадлежности исследуемых штаммов.

Согласно полученным результатам, таксономическая принадлежность была подтверждена для большинства изученных культур грибов, а 4 штамма были реидентифицированы. Так, штамм *Coniophora puteana* 003 был реидентифицирован как *Bjerkandera adusta*; штамм *Gloeophyllum sepiarium* – как *Gloeophyllum trabeum*; штамм *Gloeophyllum* sp. 2355 – как *Daedaleopsis confragosa*; штамм *Phlebiopsis gigantea* 011 – как *Dichomitus squalens*.

В результате, для дальнейшего исследования было отобрано 13 штаммов 5 видов (*Antrodia xantha*, *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Neolentinus lepideus* и *Serpula himantioides*), обладающих наибольшей скоростью роста, а также морфологическими особенностями (хламидоспоры, мицелиальные кольца и др.), характеризующими адаптационный потенциал этих грибов.

Следующим этапом было культивирование грибов на 4-х агаризованных средах с добавлением карбоната кальция (в массовой доле 0,5 г/л) с целью выявления общей

кислотопродукции штаммов, что имеет значение при деструкции древесины (подкисление среды может ускорять этот процесс). В ходе данного эксперимента у штаммов из родов *Coniophora*, *Serpula* и *Antrodia* была отмечена наиболее высокая ацидофицирующая активность. Эти грибы известны как одни из наиболее опасных деструкторов древесины. В их культурах формировались многочисленные кристаллы (предположительно, оксалатов кальция). Дальнейшие исследования в данном направлении позволят лучше понимать механизм воздействия на древесину метаболитов домовых грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-06211 и гранта СПбГУ 1.37.151.2014.

Морфологические и анатомические особенности форм (экад) *Fucus vesiculosus* L.

Кандалакшского залива Белого моря

Кривова Зинаида Викторовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

kosiareva@mail.ru

Fucus vesiculosus – широко распространенный бореальный вид бурых водорослей, населяющий все экотопы: от средней литорали до верхней сублиторали. Разнообразие форм очень велико, однако анализа особенностей анатомического строения ранее не проводили. Строение клеток может отображать особенности приспособления вида к обитанию в разных окружающих условиях.

Цель данной работы: выявить различия в морфологии и анатомии разных экологических форм (экад) *F. vesiculosus*.

Материал собирали с июля по август 2015 года в Чернореченской губе Кандалакшского залива Белого моря. У образцов измеряли ряд морфологических параметров (длина таллома, длина стволика, параметры рецептакул и т.д.), а также анатомических (параметры клеток разных слоёв).

Было установлено, что в исследованном регионе обитают пять форм *F. vesiculosus*: типичная защищенных берегов (средняя и нижняя литораль; прикрепленная), типичная прибойных берегов (средняя и нижняя литораль; прикрепленная), f. *giganteus* (верхняя сублитораль; прикрепленная), есад. *vehovianus* (верхняя сублитораль; бентоплейстонная), есад. *muscoides* (средняя литораль; неприкрепленная). Есад. *vehovianus* (186±54 мм) и есад. *muscoides* (43±13 мм) отличаются наименьшим размером, почти цилиндрической формой таллома, редкими воздушными пузырями и рецептакулами. Прикрепленные формы сохраняют типичный план строения таллома, но отличаются рядом количественных признаков: длина рецептакул у есад. *vehovianus* – 7±1 мм, у есад. *muscoides* – 9±2 мм, у типичной – 16±5 мм. Наименьшие прирост, ширина таллома и размеры пузырей обнаружены у образцов из прибойного района. Длина таллома (999±368 мм) и ширина приростов (19±5 мм) f. *giganteus* в два раза больше, чем у других прикрепленных форм (у типичной – 540±179 мм и 9±1 мм соответственно). Длина и ширина его рецептакул не отличаются от типичной формы, но их толщина значительно меньше.

Мы обнаружили различия в размерах клеток эпидермального слоя разных форм. Они крупнее у организмов из приливно-отливной зоны, чем у сублиторальных образцов.

Мы впервые провели сравнение количественных морфологических и анатомических признаков высокополиморфного вида и выявили достоверные различия этих параметров у

форм и экад *F. vesiculosus*. Таким образом, местообитание влияет не только на морфологию, но и на анатомические особенности таллома.

Микобиота *Saccharina latissima* в районе ББС МГУ

Куликова Александра Сергеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
all-exa@ya.ru

Так же как в наземных и пресноводных местообитаниях, грибы в морской среде проявляют себя как сапротрофы, паразиты животных, эндосимбионты и паразиты водорослей и морских растений. Грибы являются компонентами морских экосистем, и потому их изучение важно для понимания функционирования сообществ.

В настоящем исследовании был изучен видовой состав микобиоты морской капусты *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders в Кандалакшском заливе Белого моря.

С этими целями в августе 2015 г. в окрестностях Беломорской биологической станции имени Н.А.Перцова МГУ имени М.В. Ломоносова (ББС МГУ) с литорали и глубины 5 метров было собрано по 10 талломов ламинарии, участки которых инкубировали для выделения изолятов грибов в чашках Петри. Фрагменты таллома предварительно стерилизовали промыванием в стерильной воде; питательная среда для первичных посевов была приготовлена на основе морской воды и талломов ламинарии (для приготовления 1 л среды использовалось 50 г свежей ламинарии и 1 г дрожжевого экстракта). Всего из 20 талломов *S. latissima* было сделано 300 первичных посевов.

После двух месяцев инкубации из первичных посевов было выявлено 706 изолятов мицелиальных грибов. 191 из них принадлежат к роду *Acremonium* Link и морфологически сходным родам, 25 – к роду *Alternaria* Nees и морфологически сходным родам, 36 – к роду *Cladosporium* Link.

Общее число КОЕ дрожжей – 1991, при этом из глубоководных талломов было выделено в среднем в 7 раз больше дрожжевых колоний, чем с литорали; изолятов мицелиальных грибов с глубоководных ламинарий так же выделилось в культуру больше, чем с литоральных талломов. Причиной этих различий может быть отсутствие сильного течения в месте отбора проб на глубине и другие факторы. В результате посевов была создана коллекция из 103 чистых культур микромицетов для дальнейшего изучения.

Сравнительный анализ спектров секретируемых пептидаз

некоторых представителей рода *Fusarium*

Лавренова Виктория Николаевна

НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
pkviktor@mail.ru

Исследование активности пептидаз, секретируемых грибами-микромицетами, является перспективным методом определения трофического статуса грибов и обнаружения их адаптаций к условиям среды. Интереснейшим объектом для изучения биохимических особенностей адаптаций микромицетов к разнообразию субстратов и источников питания являются грибы рода *Fusarium*, возбудители заболеваний растений, продуценты высокотоксичных для человека и животных вторичных метаболитов.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании спектров пептидаз, секретируемых штаммами рода *Fusarium*, приспособленными к разным условиям среды (от эндофитов до сильных фитопатогенов).

В ходе работы были изучены моноспоровые культуры 12 штаммов 4 видов *Fusarium* (*F. poae*, *F. sibiricum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*), предоставленные профессором ФГБНУ ВИЗР Гагкаевой Т.Ю. Класс-специфическая активность секретируемых в течение семисуточного погружённого культивирования пептидаз определялась спектрофотометрически по степени гидролиза синтетических пара-нитроанилидных субстратов: $N\alpha$ -benzoyl-L-Arg-pNA использовали для измерения трипсин-подобной, Glp-Ala-Ala-Leu-pNA – субтилизин-подобной, Glp-Phe-pNA – химотрипсин-подобной активности и Glp-Phe-Ala-pNA – активности цистеиновых пептидаз. Для определения аминопептидазной активности использовали L-Leu-pNA и L-Phe-pNA.

В культуральной жидкости исследованных штаммов были обнаружены высокие уровни активности трипсин-подобных, субтилизин-подобных пептидаз и аминопептидаз. Внутривидовая вариация уровней активности пептидаз оказалась неожиданно большой. Согласно результатам дисперсионного анализа, наиболее активно пептидазы всех изученных нами классов секретируют штаммы *F. langsethiae*, наименее активно – штаммы *F. poae*. По данным кластерного анализа изученные штаммы *Fusarium* разбиваются на две группы: 1) группу с небольшой активностью всех классов пептидаз; 2) группу с высокой активностью субтилизин-подобных пептидаз и аминопептидаз. К первой группе относились все штаммы *F. poae*, по 2 штамма *F. sibiricum* и *F. sporotrichioides*, один штамм *F. langsethiae*; во вторую группу попали два штамма *F. langsethiae*, по одному штамму *F. sibiricum* и *F. sporotrichioides*.

Результаты статистических анализов могут быть частично объяснены данными по токсинопродукции и трофическим статусом исследуемых видов, среди которых *F. sibiricum* и *F. langsethiae* являются эндофитами, *F. poae* – слабым фитопатогеном, *F. sporotrichioides* – сильным фитопатогеном. Небольшая активность пептидаз *F. poae* коррелирует с его малой патогенностью и следовой продукцией трихотеценовых микотоксинов. Эндофиты *F. sibiricum* и *F. langsethiae*, наряду с сильным патогеном *F. sporotrichioides*, активно секретируют пептидазы, что коррелирует с высокими уровнями продукции трихотеценовых микотоксинов и, вероятно, свидетельствует о высоком уровне метаболизма.

**Перспективы применения препаратов на основе фитопатогенных микромицетов
для борьбы с борщевиком Сосновского**

**Максимова Елизавета Борисовна^{1,3}, Мушенко Вероника Михайловна^{2,3},
Сокорнова Софья Валерьевна³**

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Россия, Санкт-Петербург

²Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, Санкт-Петербург

³Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР),
Россия, Санкт-Петербург

e.maxinova.stg@gmail.com, maybe.nika@mail.ru, tynryk@gmail.com

Несмотря на активную борьбу против борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowsky* Manden.), его ареал распространения ежегодно увеличивается больше чем на 10%. Биологическая инвазия наносит огромный урон экологии и сельскому хозяйству регионов.

Работа проводилась с 19 штаммами микромицетов, выделенные из растений рода *Heracleum*, из рабочей коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВИЗР), которые были идентифицированы по локусам большой субъединицы рРНК 28 S (LSU), гена фактора элонгации трансляции (EF 1645F, EF1 119OR) и гена β -тубулин (T1, T2). Растения в фазе розетки (3-5 настоящих листьев) обрабатывали мицелиальной суспензией на основе фосфатного буфера с различными значениями рН (от 4 до 8 с интервалом 0.5), содержащей химический гербицид с действующим веществом глифосат в латентной дозе на территории Пушкинского района в июне 2015 года в вечернее время при температуре больше 22°C. Биологическую активность суспензии оценивали по площади поражения листьев. Опыты проводились дважды в шести повторностях.

Скрининг изолятов фитопатогенных грибов по площади поражения наземной части растений борщевика Сосновского в фазе розетки на 3-и и 7-е сутки после заражения выявил два наиболее агрессивных в отношении него штамма. С помощью морфолого-культуральных и молекулярно-генетических методов микромицеты были идентифицированы до вида как *Ph. complanata* и *S. heliopsisidis*.

Так как ранее было показано, что гербицид в рабочей концентрации не оказывает влияние на рост и развитие штаммов *Ph. complanata* и *S. heliopsisidis*. было выдвинуто предположение о том, что кислый рН мицелиальной суспензии может влиять на биологическую активность химического гербицида, переводя его в плохо растворимую форму. Оценка эффективности действия композиции с изменением ее рН в пределах от 4.0 до 8.0 позволило выявить оптимальные значения 6.0-6.5. В опытах *in vitro* на третьи сутки после заражения композицией с рН 6.0, содержащей фрагменты мицелия гриба в концентрации $5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл и глифосата в концентрации 0.1 мг/мл, наблюдались 70-80% некрозы листьев борщевика Сосновского. Оценка анализа эффективности такой композиции по формуле Колби с учетом поправки для биологических систем, введенной Гизи, показало наличие синергетического эффекта.

Таким образом, при разработке биологических препаратов для борьбы с гигантскими борщевиками в качестве инфекционных единиц могут быть использованы не только конидии, но и фрагменты мицелия фитопатогенов *Ph. complanata* и *S. heliopsisidis*. Эффективность мицелиальной суспензии можно увеличить путем включения в ее состав глифосата в латентной дозе при нейтральных значениях рН раствора.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 16-16-00085 "Разработка технологий получения и применения микогербицидов для борьбы с трудноискоренимыми сорными растениями".

**Микоризообразующие грибы Шикаохского государственного заповедника
Республики Армения**

Маркарян Лусине Вагановна, Степанян Ануш Степановна
Ереванский государственный университет, Армения, Ереван
lusinemargarian@rambler.ru

Истребления лесов является важнейшей экологической проблемой, и в связи с этим одной из главных задач охраны природных ресурсов и окружающей среды в особо охраняемых природных территориях (ООПТ) является как рациональное использование лесов, так и осуществление лесовосстановительных работ. В восстановлении лесов немаловажную роль играют грибы-микоризообразователи, которые используются в качестве физиологически активных объектов в сельском хозяйстве.

Целью настоящей работы явилось изучение микоризообразующих макромицетов, которые составляют значительную часть макроскопических грибов известных в настоящее время в Шикаохском заповеднике.

Материалом для данной работы послужили микоризообразующие грибы, собранные нами на территории Шикаохского заповедника в течение 2009-2015 гг.

Основными лесообразующими породами на изученной территории являются бук восточный (*Fagus orientalis*), дуб крупнопольниковый (*Quercus macranthera*), дуб грузинский (*Q. iberica*), граб кавказский (*Carpinus caucasica*), клен полевой (*Acer campestre*), клен грузинский (*A. ibericum*), клен гирканский (*A. hyrcanum*) и др. Здесь находится также самая крупная на Кавказе платановая роща (*Platanus orientales*).

В результате исследования таксономического состава микоризных грибов Шикаохского заповедника зарегистрировано 94 вида, которые принадлежат к классу *Agaricomycetes*. Сюда входят все представители семейств *Amanitaceae*, *Boletaceae*, *Gomphidiaceae*, *Gomphaceae*, *Russulaceae*, *Suillaceae*, все виды рода *Cortinarius*, некоторые виды родов *Entoloma*, *Hebeloma*, *Inocybe* и др.

Микоризные грибы заповедника обнаружены во всех изученных лесных формациях, но большинство из них встречаются в лиственных лесах (64 вида). В хвойных лесах зарегистрировано 46 видов, а в смешанных – 40. Исследуемые грибы могут образовывать микоризу как с несколькими древесными породами, так и иметь узкую специализацию, образуя микоризу с определенными видами деревьев. Так, *Amanita pantherina*, *Boletus edulis*, *Cortinarius armillatus* и др. приурочены как к лиственным, так и к хвойным породам, а, например *Chroogomphus rutilus*, *Russula queletii* образуют микоризу только с сосной. Исследования в этом направлении продолжаются.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Госкомитета по науке Министерства высшего образования Армении (грант N 15T-1F190).

**К изучению лишайников музейно-этнографического и экологического
парка Югра (Тюменская область)**

Мингалимова Александра Игоревна

Нижневартовский государственный университет, Нижневартовск

МАУ «Экоцентр», Россия, Мегион

ksanne-86@mail.ru

Обсуждаемые исследования обусловлены фрагментарными данными по лишенофлоре Нижневартовского района. Под влиянием антропогенного воздействия, в частности нефтяных загрязнений, происходит стремительное разрушение естественных стадий лишайниковых сообществ, страдают качественные и количественные показатели.

Материалом для оригинальных исследований послужили 211 гербарных образцов собранных автором летом 2015 года на территории музейно-этнографического и экологического парка Югра, расположенного в окрестностях г. Мегион. Парк включает в себя участок заболоченной тайги, окружен нефтепромышленными предприятиями.

Исследования проведены классическими методами, принятыми в лишенологии. Объем порядков, семейств и родов приведен в соответствии с системой, представленной на обновляющемся электронном ресурсе Index Fungorum

В результате первых исследований флора лишайников МЭиЭП-Югра в настоящее время насчитывает 85 видов из 36 родов и 17 семейств. Систематический спектр лишенофлоры показывает, что в ее составе представлены виды из 8 порядков: *Arthoniales*, *Baeomycetales*, *Candelariales*, *Lecanorales*, *Lecideales*, *Peltigerales*, *Pertusariales*, *Teloschistales*.

Основу лишенофлоры составляют лишайники порядка *Lecanorales*, которые включают 49 видов, что составляет 57,6% от общего числа видов. Остальные 7 порядков распределяются следующим образом: *Teloschistales* – 14 видов, *Peltigerales* – 12 видов, порядки *Arthoniales*, *Lecideales*, *Baeomycetales* – 2 вида, порядки *Candelariales*, *Pertusariales* – по 1 виду.

Лидирующими семействами являются *Parmeliaceae* (22 вида), *Cladoniaceae* (10), *Peltigeraceae* (10) и *Lecanoraceae* (9 видов), одновидовыми – 5 семейств: *Icmadophilaceae*, *Candelariaceae*, *Carbonicolaceae*, *Pilocarpaceae*, *Mycoblastaceae*.

К крупнейшим родам относятся: *Cladonia* (10 видов), *Peltigera* (10), *Lecanora* (8), *Bryoria* (7). Из общего спектра одновидовые составляют 22,4% (19 родов): *Amandinea*, *Athallia*, *Carbonicola*, *Cetraria*, *Flavoplaca*, *Icmadophila*, *Imshaugia*, *Lecidella*, *Lecidea*, *Melanelixia* *Melanohalea*, *Micarea*, *Mycobilimbia*, *Mycoblastus*, *Parmelia*, *Parmeliopsis*, *Parvoplaca*, *Phaeophyscia*, *Vulpicida*.

Выделены 5 зональных географических элементов: бореальный, неморальный, гипоарктомонтанный, арктоальпийский и монтанный. По типам ареалов отмечено значительное участие видов, имеющих обширные типы ареалов: плурирегиональных – 32 вида (37,6%), голарктических – 21 вид (24,7%), евразоамериканских – 16 видов (18,8%).

По субстратным группам основу формируют эпифитные 53 вида, или 62,4%. В составе эпигейных – 13 видов, или 15,3%. Полисубстратные представлены *Parmeliaceae*, *Peltigeraceae*, *Cladoniaceae*, ведущими родами этой группы являются *Peltigera*, *Cladonia*.

К доминантным жизненным формам относятся однообразнонакипные цельнокорковые (17,6%), однообразнонакипные зернисто-бородавчатые и бугорчатые (15,3%), листоватые розетковидные рассеченнолопастные ризоидальные (11,8%).

Найдено 2 редких занесенных в Красную книгу ХМАО-Югра: *Bryoria bicolor* (Ehrh.) Brodo et D. Hawksw. и *Bryoria capillaris* (Ach.) Brodo et D. Hawksw

Первичный список исследований лишайнофлоры насчитывает 85 лишайников из 36 родов и 17 семейств. В лишайнофлоре выделены 5 зональных географических элементов, 6 типов ареалов. По отношению к субстрату – 3 группы, с преобладанием эпифитов. Жизненные формы - доминанты составляют 44.7% от списка. Отмечены 2 охраняемых вида для ХМАО-Югры. Таким образом, по предварительным данным отмечается принадлежность лишайнофлоры МЭиЭП-Югра к бореальному типу с элементами ее не типичности.

**Систематика зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales*: новые данные
Москаленко Светлана Валентиновна¹, Темралеева Анна Дисенгалиевна^{1,2}**

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
Россия, Пуццино

²Пуццинский государственный естественно-научный институт, Россия, Пуццино
moskalenkosvetlana@yandex.ru, temraleeva.anna@gmail.com

Порядок *Protosiphonales* объединяет зеленые микроводоросли с различной морфологической организацией таллома, с двужгутиковыми изоконтными зооспорами с базальными телами, смещенными по часовой стрелке, преимущественно обитающие в почвах и способные к гиперсинтезу липидов и вторичных каротиноидов (Костиков и др., 2001). С точки зрения молекулярной филогенетики он соответствует кладе *Stephanosphaerinia*, выделенной на основе 18S рРНК-анализа.

Целью работы стала классификация протосифональных микроводорослей, используя полифазный подход. Для этого была проведена морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация 6 аутентичных штаммов группы, полученных из коллекции АСКУ, а также 2 диких штаммов АСССИ. Дополнительно была изучена информация по морфологии и экологии протосифональных микроводорослей из ряда отечественных и зарубежных работ, составлена выборка последовательностей гена 18S рРНК из базы данных GenBank, на основе которой проводился филогенетический анализ.

В результате мы предлагаем разделить порядок *Protosiphonales* на 4 группы, 3 из которых могут соответствовать семействам, и 1 имеет неопределенный статус:

1. *Stephanosphaeraceae*: *Dunaliella polymorpha*, *D. primolecta*, *D. quartiolecta*, *D. tertiolecta*; *Chlamydomonas applanata*; *Chlorogonium capillatum*, *C. elongatum*, *C. euchlorum*; *Balticola buetschlii*, *B. capensis*, *B. droebakensis*, *B. zimbabwiensis*; *Stephanosphaera pluvialis*, *S. sp.*; *Hamakko caudatus*. Включает морские и пресноводные одноядерные водоросли с монадным типом таллома.

2. *Chlorococcaceae*: *Chlorococcum robustum*, *C. microstigmatum*, *C. citriforme*, *C. oleofaciens*, *C. sphacosum*, *C. vacuolatum*, *C. isabeliense*, *C. minutum*, *C. ellipsoideum*, *C. aquaticum*; *Macrochloris radiosa*, *M. rubrioleum*; *Deasonia granata*; *Chlamydropodium starrii*, *C. vacuolatum*; *Rhopalosolen saccatus*; *Neospongiococcum gelatinosum*; *Pleurastrum insigne*; *Chloromonas perforata*; *C. debaryana*. Характеризуются преимущественно коккоидной организацией таллома, 1 пиреноидом со сплошной крахмальной оберткой, неметаболическими зооспорами, утолщающейся слизистой оболочкой, почвенным местообитанием, гиперсинтезом липидов и вторичных каротиноидов.

3. Protosiphonaceae: *Protosiphon botryoides*; *Chlorosphaeropsis alveolata*; *Spongiochloris spongiosa*; *Chlorochytrium lemnae*, *C. hypanicus*; *Spongiosarcinopsis terrestris*; *Chlorosarcinopsis aggregata*, *C. dissociata*, *C. bastropiensis*; *Pachycladella umbrina*. Отличаются голыми зооспорами, гиперсинтезом вторичных каротиноидов, фрагментацией крахмальной обертки пиреноида.

4. Protosiphonales *incertae sedis*: *C. minor*; *N. sp.*; *D. multinucleata*; *C. nivale*, *C. diplobionticum*; *Tetracystis tetraspora*; *Nautococcus solutus*; *Ettlia minuta*.

Работа поддержана проектом РФФИ № 15-54-04002 бел_мол_a.

О сохранности панцирей диатомовых водорослей в торфяном разрезе с о. Симия (Алеутские острова, США)

Неплюхина Алиса Андреевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
taviliss@gmail.com*

Диатомовый анализ донных отложений озер и торфяных отложений является одним из главных методов в палеолимнологии и палеоэкологии, используемых для реконструкции изменений окружающей среды в прошлом. Однако осадочные отложения панцирей диатомовых водорослей не всегда отражают особенности именно того сообщества живых организмов, из которых они были отобраны. На преобразование диатомовых сообществ в окаменелости влияет сложный комплекс специфических тафономических процессов. Изменения зависят от различной сохранности видов, главным образом, их растворимости за время прохождения толщи воды и затем в осадках. Изучение степени и условий сохранности панцирей позволяет сделать определенные выводы о физико-химических показателях среды.

Образцы торфа, отобранные в 1999 г. из колонки на о. Симия (Аляска, США), были разделены на слои по 5 см. Очистку образцов от органического содержимого проводили по методике, изложенной в руководстве Келли с соавт. (Kelly et al., 2011). Исследование материала проводили методами световой и электронной микроскопии.

В результате исследований было определено более 10 родов диатомовых водорослей, которые обладали разной степенью сохранности панцирей (вне зависимости от возраста отложения), в связи с чем идентификация их до видового и/или родового уровня вызывает проблемы. С одной стороны, были выявлены виды с более тонким панцирем: панцири этих видов преимущественно растворяются, однако, подлежат идентификации до рода (например, *Cavinula*, *Stauroforma*). С другой стороны, нами отмечены виды, имеющие более грубые панцири, которые, очевидно, претерпевали механическое воздействие: эти виды представлены обломками, что затрудняет их определение до вида (например, *Eunotia*).

По литературным данным известно, что растворение панцирей происходит в щелочной среде. Однако мы пока не можем однозначно сделать вывод об условиях формирования диатомовых сообществ из исследованного отложения, так как в нем присутствуют ацидофильные виды, т.е. характерные для водоемов в пониженном рН (например, представители рода *Eunotia*). По-видимому, вопрос об условиях сохранности панцирей диатомей в отложениях требует дальнейшего изучения.

Микологическая контаминация воздуха жилых помещений города Сургута

Новак Анна Сергеевна

Сургутский государственный университет,
Институт Естественных и Технических наук, Россия, Сургут
mysoul-happiness@mail.ru

Плесневые грибы способны негативно воздействовать на живые организмы, оказывая токсическое действие. Нормативных документов, отражающих допустимые концентрации спор микромицетов в жилых квартирах, нет. Поэтому необходимо определить микологическую и микробную контаминацию воздуха жилых квартир г. Сургута.

Исследование проводилось на 8 модельных квартирах в течение года (апрель 2015г. – февраль 2016г.). Квартиры расположены в типовых панельных домах в городе Сургуте. Из 8 исследуемых помещений 5 квартир (№1, №4, №5, №6, №7) находятся в 9-этажных домах, 1 квартира (№8) – в 8-этажном доме, 2 квартиры (№2, №3) – в 5-этажных домах. Квартиры №5 и №7 расположены около многополосных автодорог. А вот квартиры №3, №4, №6 отдалены от автодорог. Отбор проб воздуха осуществлялся в гостевых комнатах седиментационным методом на чашки Петри со средами Сабуро и Чапека-Докса с дальнейшей инкубацией, микроскопированием и идентификацией изолятов. Количество пропагул рассчитывали по формуле Омелянского. Также проводили оценку эффективности фунгицидных препаратов. В качестве испытуемых препаратов использовались: БиО Ремонт и АКВА. В качестве тест-культур использовались: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*. На чашки Петри с водными суспензиями этих тест-культур в стерильных условиях распылялись фунгицидные препараты. После 3-х дней инкубации оценивали рост микромицетов.

В результате исследования были выявлены сезонные колебания общей микробной численности почти для всех квартир с пиком этого показателя в весенний период – 1747,67 КОЕ/м³. Зимой наименьшая микробная контаминация воздуха – 320,46 КОЕ/м³. В летний и осенний период этот показатель равен 453,32 и 700,98 КОЕ/м³ соответственно. Наиболее высокое микробное число во все сезоны выявлено в квартирах №1 и №6, причем в весенний период этот показатель превышает уровень «чистого» состояния воздуха в данных помещениях, а наименьшее – квартиры №5 и №7. Наибольшее количество пропагул так же обнаружено весной – 1117,99 КОЕ/м³, а вот наименьшее осенью и зимой – 27,03 и 31,96 КОЕ/м³ соответственно. Наибольшее количество спор оказалось в квартирах №1, №6 и №4 и в весенний период этот показатель превышает норму для всех трех помещений. Полученные данные можно объяснить сезонными колебаниями численности микромицетов в наружном атмосферном воздухе. Так же, для квартир №1 и №6 характерны общие факторы – наличие открытых плесневых поражений стен и одинаковые температурно-влажностные параметры.

Наиболее часто встречающиеся роды микромицетов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* и в том числе патогенные для человека виды, обнаруженные в квартирах №1, №6 – *Asp. niger*, *Asp. flavus*, *Alt. alternata*. Всего было выделено 5 родов и около 50 видов.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что на высокую микробную и грибковую контаминацию воздуха наиболее сильное влияние оказывают такие факторы как неудовлетворительное состояние вентиляционных систем, несоответствие температурно-влажностного режима внутри помещения, расположение

квартир на первых этажах здания, наличие большого количества домашних животных. Кроме того, микобиота жилых помещений г. Сургута характеризуется незначительным видовым разнообразием, однако присутствуют аллергенные виды. Также установлено, что использование фунгицидных препаратов «Аква» и «Bio» эффективно против *Asp. niger* на 70%, против *Asp. flavus* на 94,5%.

Влияние эндофита на развитие *Festuca gigantea* в условиях дефицита минерального питания

Попкова Екатерина Геннадиевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

kattyworld@yandex.ru

Симбиозы между растениями и грибами привлекают пристальное внимание исследователей всего мира. Особым интересом пользуются эндосимбиотические грибы злаков. Они способны повышать конкурентоспособность растения-хозяина, обеспечивая защиту от фитофагов и устойчивость к неблагоприятным условиям среды.

Данная работа посвящена изучению влияния эндофитной инфекции на ростовые характеристики овсяницы гигантской (*Festuca gigantea* (L.) Vill.) в условиях дефицита источников фосфора и/или азота.

Исследование проводили на проростках *F. gigantea*, полученных из семян со 100 %-ной зараженностью, собранных на ЗБС МГУ летом 2014 года. Часть семян предварительно обрабатывали сухим жаром в термостате для получения варианта, не зараженного эндофитом. В эксперименте использовали среду Кнопа; варьировали эндофит-статус растений, т. е. наличие (E+)/отсутствие (E-) эндофита, а также присутствие/отсутствие в среде источников фосфора и/или азота. Растения инкубировали один месяц, после чего измеряли ростовые характеристики. Результаты обрабатывались в программе Statistica.

Показано, что длина первого листа значимо выше в присутствии фосфора, а длина корня определяется присутствием гриба (у зараженных растений корень в среднем длиннее).

Длина второго листа зависит как от эндофита, так и от сочетания других факторов. При отсутствии фосфора и азота второй лист «E+» растений имеет статистически значимо большую длину, нежели «E-». Если в среде присутствует только азот, значения длины второго листа «E+» растений снижаются, а у «E-» – возрастают до некоторой величины, которая приближается к максимальным значениям для «E+». В присутствии фосфора «E+» растения имеют более длинный второй лист вне зависимости от присутствия азота. То есть зараженные растения овсяницы гигантской имеют более развитый второй лист, что особенно выражено в условиях дефицита минеральных веществ.

На биомассу оказывает влияние сочетание всех факторов. На дефицитной среде зеленая биомасса «E+» растений больше, чем «E-», однако в присутствии азота для «E+» растений наблюдается ее резкий спад, тогда как биомасса «E-» растений при наличии азота приближается к значению «E+» на дефицитной среде.

Таким образом, «E+» растения имеют более высокие показатели как в условиях голодания по азоту и фосфору, так и на полных средах. Однако азот при отсутствии фосфора оказывает на ростовые характеристики «E+» растений негативное влияние,

снижая прирост биомассы и длину 2-го листа, в то время как у «Е-» растений наблюдается противоположный эффект.

Первичный скрининг штаммов грибов – продуцентов пероксидаз

Пугачева Татьяна Геннадьевна

Белорусский государственный университет, Республика Беларусь Минск

tanya_pugacheva@tut.by

При диагностике различных заболеваний, а также мониторинге биотехнологических процессов в настоящее время широко применяют ферментативные методы анализа. При этом часто используются сопряженные реакции, катализируемые различными ферментами. Благодаря сопряженным системам расширяется круг определяемых веществ и повышается чувствительность анализа.

Цель данной работы: поиск мицелиальных грибов – продуцентов оксидоредуктаз, сходных по своим каталитическим свойствам с пероксидазой из корней хрена и способных к работе в сопряженных реакциях с глюкозооксидазой.

Первоначально проверена возможность использования для составления дифференциально-диагностических агаризованных сред 16 субстратов, окисляемых в процессе катализа пероксидазой из корней хрена. Основным критерием оценки было наличие хорошо проявляющейся окраски реакционной смеси (интенсивной и визуально определяемой) и неспособность субстрата самоокисляться на воздухе. По данным критериям были отобраны пирокатехин, 3,3,5,5-тетраметилбензидин, п-фенилендиамин дигидрохлорид, орто-дианизидин. В последующем установлено, что только 3,3,5,5-тетраметилбензидин и орто-дианизидин выдерживали термическую обработку и не изменяли свою окраску при введении в «горячую» (~ 50 °C) агаризованную среду. Поскольку пероксидаза катализирует реакции окисления всех проверенных субстратов только в присутствии пероксида водорода, необходим его источник. Как известно, пероксид водорода образуется в процессе ферментативной реакции окисления глюкозы, катализируемой глюкозооксидазой. В результате экспериментов была подобрана система, содержащая 2 ед/мл глюкозооксидазы *Penicillium adametzii* и 1% глюкозы, обеспечивающая генерацию достаточного количества пероксида водорода для пероксидазного катализа в составе агаризованных сред. В качестве контроля использовали среды без добавления глюкозооксидазы.

С использованием подобранных сред проведен анализ 80 штаммов грибов, выделенных из различных природных источников, относящихся к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Acremonium*. Установлено, что 20 штаммов грибов рода *Penicillium*, 1 штамм рода *Acremonium* и 1 штамм рода *Myrothecium* дают зоны окраски на среде с о-дианизидином. Последующая перепроверка культур на среде с 3,3,5,5-тетраметилбензидином позволила отобрать *Myrothecium sp.*, вокруг которой образовывалась синяя окрашенная зона, что свидетельствует о синтезе гемовой оксидоредуктазы.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны среды для скрининга штаммов грибов, синтезирующих оксидоредуктазы, способные к работе в сопряженной реакции с глюкозооксидазой. С использованием подобранных сред отобран штамм *Myrothecium sp.*, продуцирующий предположительно гемовую пероксидазу.

Липидный спектр дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях температурного и pH-стрессов

Секова Варвара Юрьевна¹, Дергачева Дарья Игоревна^{1,2}

¹ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

²ФГБОУ ВПО Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва
beauveria606@gmail.com

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* впервые выделенные D. Yarrow в 1969 г. – промышленный микроорганизм, который применяется для синтеза липидных компонентов *de novo*, а также ассимиляции гидрофобных веществ извне, что позволяет ему внутриклеточно накапливать липиды более 50% сухой биомассы. *Y. lipolytica* обладает высоким адаптационным потенциалом к таким неблагоприятным факторам как повышенная температура и экстремальные значения pH среды. Поэтому мы исследовали липидный состав клеток *Y. lipolytica*, выращенных при воздействии экстремальных значений pH среды культивирования (4.0 и 9.0) и повышенной температуре (+37°C), а также при их комбинированном воздействии.

Культуру дикого типа дрожжей *Y. lipolytica* W29 выращивали на синтетической среде YNB с глицерином в качестве источника углерода. Оптимальным значением pH для культивирования данного организма признано значение 5.5, кислый и щелочной стресс в данной работе моделировали при pH 4.0 и 9.0 соответственно. Тепловой стресс индуцировался при температуре +37°C. Состав нейтральных липидов определяли методом восходящей тонкослойной хроматографии. Жирнокислотный состав изучали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Кристалл 5000.1» (ЗАО «Хроматек», Россия).

Количество общих липидов для вариантов, растущих при pH 5.5, 4.0 и 9.0, составило 3.0, 3.0, 2.2% от сухой массы соответственно. Основными ацилглицеринами являлись свободные жирные кислоты и триацилглицерины. При введении дополнительного стрессового фактора (повышении температуры до +37°C) у клеток, выращенных при pH 5.5 и 9.0, количество общих липидов составляло 4,6% и 1,7% от сухой массы соответственно. Анализ жирнокислотного состава фосфолипидов показал, что как повышение, так и понижение pH среды приводили к увеличению степени ненасыщенности (СН) жирных кислот в основном за счет увеличения доли линоленовой кислоты. Тепловые воздействия приводили к снижению СН ацильных цепей всех фосфолипидов.

Полученные данные можно объяснить важной ролью линоленовой кислоты в составе клеточных мембран, которая обеспечивает функционирование пути Rim10, обуславливающего устойчивость клеток к щелочным условиям. Понижение ненасыщенности жирных кислот под воздействием теплового шока можно объяснить необходимостью снижения текучести клеточных мембран, которая неизбежно увеличивается при возрастании температуры.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00-634 мол_а.

**Влияние условий замораживания на сохранность клеток каротиногенной
микроводоросли *Haematococcus pluvialis* BM1 (IPPAS H-2018)**

Титов Алексей Евгеньевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

aetitov@live.ru

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) – продуцент широко применяемого кетокаротиноида астаксантина. Накопление пигмента сопровождается переходом метаболически активных вегетативных клеток (ВК) в гематоцисты, более устойчивые к неблагоприятным условиям. Исследовали влияние условий замораживания на сохранность микроводоросли.

Для замораживания брали клетки *H. pluvialis* IPPAS H-2018 из жидкой культуры и концентрировали биомассу до 15 мг/л по содержанию хлорофилла. Замораживание осуществлялось различными способами. Для выяснения влияния криопротекторов в культуру добавляли смесь 2% ДМСО и 5% глицерина по сухой массе клеток. Было изучено шесть экспериментальных вариантов: без криопротектора при медленном охлаждении до -80°C в кельвинаторе и быстром охлаждении до -196°C в жидком азоте, а также с криопротектором – в каждом случае брали ВК и гематоцисты. Замороженные культуры микроводоросли хранили при -80°C в течение трех суток. Клетки размораживали на протяжении 15 минут в темноте при 20°C и переносили в жидкую минеральную среду BG-11 объемом 30 мл. Культивирование проводили в стеклянных колбах объемом 50 мл при освещенности 20 мкмоль квантов ФАР/м²/с и температуре 20°C в шейкере-инкубаторе при 120 об./мин.

Влияние условий замораживания на ультраструктуру клеток исследовали методом сканирующей электронной микроскопии. Жизнеспособность клеток определяли по аутофлуоресценции хлорофилла. Фотосинтетическую активность (ФА) оценивали величиной максимального фотохимического квантового выхода фотосистемы II $\phi_0(\text{ФСII})$. Способность к фотозащите оценивали параметром нефотохимического тушения Штерна-Фольмера (NPQ), характеризующим интенсивность процессов регулируемого нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла. $\phi_0(\text{ФСII})$ и NPQ определяли по кинетике флуоресценции хлорофилла *a*. Флуоресценцию хлорофилла *a* определяли на импульсно модулированном флуориметре DualPAM-100.

В оболочке ВК, замороженных без криопротектора, присутствовали перфорации, размороженные клетки не обладали характерной сферической формой. Добавление криопротектора предотвращало появление перфораций у ВК, а у гематоцист приводило к образованию небольших трещин.

У всех размороженных ВК детектировалась ФА, а NPQ – только у ВК, замороженных с криопротектором. ФА ВК с криопротектором сохранялась, а без него пропадала через четыре часа после размораживания. Низкие значения NPQ у ВК свидетельствуют об утрате фотозащитных механизмов фотосинтетического аппарата.

Максимальная выживаемость наблюдалась у гематоцист без криопротектора (60%) и у ВК с криопротектором (50%). Возможная причина лучшей сохранности гематоцист – меньшая доля содержания воды в клетках и отсутствие активного ФСА. Это снижает риск фотоповреждения и разрушения хрупких внутриклеточных структур кристаллами льда.

Таким образом, были подобраны оптимальные условия замораживания клеток микроводоросли: вегетативные клетки следует замораживать с криопротектором, а

гематоциты — без криопротектора в кельвинаторе при -80°C . Полученные результаты расширяют существующие представления о криотолерантности клеток *H. pluvialis* и механизмах повреждения их клеток при значительном охлаждении, а также способствуют более надежному сохранению изолятов и штаммов *H. pluvialis* в криоколлекциях.

Работа поддержана РФФ (грант № 14-50-00029).

Передача сигнала оксипинов в ходе светозависимой дифференцировки аскомицета *Neurospora crassa*

Харченко Евгения Александровна, Макарова Александра Михайловна

Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий,

Россия, Москва

zara-22-12@mail.ru

Оксигенированные производные насыщенных и ненасыщенных жирных кислот – оксипинов – принимают участие в процессах развития разных организмов и в их ответах на внешние воздействия. У грибов оксипиновы регулируют баланс полового и бесполого воспроизведения и целый ряд других процессов дифференцировки. Свет является одним из основных регуляторов развития грибов. Восприятие света у аскомицета *Neurospora crassa* происходит с помощью фоторецепторного комплекса WCC (white collar complex). В состав данного комплекса входят два мультидоменных белка – WC-1 и WC-2 – продукты генов *white collar-1 (wc-1)* и *white collar-2 (wc-2)*. Мутанты по этим генам не реагируют на свет. В связи с тем, что ранее в нашей группе было выявлено влияние омега-гидроксилированных производных линолевой кислоты – 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновой кислоты (18-HODE) и линоленовой кислоты – 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновой кислоты (18-HOTrE) на светозависимое образование конидий и протоперитециев у дикого типа гриба, в данной работе предпринято исследование действия этих оксипинов на процессы полового и бесполого размножения у мутантов гриба *N. crassa* по фоторецепторному комплексу – *wc-1* и *wc-2* – для выявления возможного пути передачи сигнала оксипинов в ходе светозависимых процессов воспроизведения.

Соединения (5 мкМ, 1 мл) вносили на стационарной стадии роста под целлофан, лежащий на агаризованной среде. Влияние оксипинов на образование протоперитециев у мутантных штаммов *wc-1* и *wc-2* тестировали в темноте и при освещении (2 мин светом 350-500 нм, 1Вт/м²). Для тестирования образования конидий культуру с добавленным оксипином инкубировали в темноте при 28°C в течение 1 ч и затем освещали в течение 2 ч при помощи ламп LDC-36W (Россия) с интенсивностью освещения 15 Вт/м².

При сравнительном исследовании действия оксипинов (18-HODE и 18-HOTrE, 5 мкМ) в условиях освещения выяснилось, что стимулируемое у дикого типа оксипином 18-HODE образование протоперитециев, как в темноте, так и на свету, не наблюдалось у мутантов по фоторецепторному комплексу *wc-1* и *wc-2*. Действие 18-HOTrE также не проявлялось у мутантов WCC, что заставляет предположить участие этого комплекса в регуляции формирования протоперитециев при действии рассмотренных оксипинов на *N. crassa*.

У мутанта *wc-1* добавление 5 мкМ 18-HODE к темновой культуре стимулировало конидиогенез на 54%, а 5мкМ 18-HOTrE – на 34%. Освещение необработанного оксипином мицелия этого штамма не приводило к изменению количества конидий по

сравнению с темновым уровнем. Добавление обоих соединений к культуре мутантов *wc-2* не сопровождалось изменением числа конидий ни в темноте, ни в условиях освещения.

Действие исследуемых оксилипинов на мутанты по фоторецепторному комплексу свидетельствует, по-видимому, о наличии иных путей регуляции, помимо WCC, влияющих на образование конидий в темноте. Таким образом, участие WCC комплекса в передаче сигнала оксилипинов, проявляется, по-видимому, только в ходе формирования протоперитециев.

Внеклеточные пептидазы некоторых мицелиальных микромицетов и фитопатогенез

Шамрайчук Ирина Леонидовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики,

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

irashamr@yandex.ru

Патогенные и непатогенные грибы могут служить богатым источником внеклеточных гидролитических ферментов, в том числе пептидаз. Литературные данные свидетельствуют, что конкурентные преимущества микромицетов различных эколого-трофических групп часто достигаются благодаря высокой активности определенных типов внеклеточных гидролаз. Определение стратегий расщепления белковых субстратов сапротрофными и паразитическими грибами важно для понимания роли секретлируемых пептидаз в патогенезе. Целью данной работы явились поиск и идентификация возможных маркеров фитопатогенности мицелиальных грибов.

В работе исследованы 20 штаммов мицелиальных микромицетов из родов *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* (все факультативные паразиты растений) и *Trichoderma* (сапротрофы), предоставленных из коллекций кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва, Россия), ВНИИ защиты растений (Санкт-Петербург, Россия) и ВНИИ фитопатологии (Московская область, Россия). По гидролизу азоказеина определяли общую протеолитическую активность (исследован диапазон pH 6–8), п-нитроанилидных синтетических субстратов – специфическую. Были изучены внеклеточные трипсин-, химотрипсин- и субтилизин-подобные активности, а также активности цистеиновых пептидаз и аминокислотных пептидаз в культуральной жидкости штаммов.

Сравнительный анализ общей протеолитической активности у микромицетов при росте (при 22°C, 180 об./мин) в жидкой модифицированной среде Чапека с казеином в качестве индуктора секреции пептидаз показал, что у штаммов-фитопатогенов общая протеолитическая активность различна и ее максимум указывает на присутствие у них кислых, нейтральных или щелочных пептидаз. Среди культур-сапротрофов из рода *Trichoderma* наличие нейтральных пептидаз обнаружить не удалось.

Определено, что все штаммы-фитопатогены секретировали трипсин-подобные ферменты (разной степени активности), тогда как у трех из пяти штаммов триходерм они не были выявлены, что хорошо коррелирует с результатами, полученными нами на других сапротрофных микромицетах. Для обеих групп грибов были характерны различные уровни активностей субтилизин-подобных ферментов, а также химотрипсин-подобных, цистеиновых пептидаз и аминокислотных пептидаз. У 10 из 15 штаммов из группы фитопатогенных микромицетов активность субтилизин-подобных пептидаз была выше активности трипсин-подобных ферментов. Наиболее высокими активностями трипсин- и субтилизин-

подобных ферментов обладали представители рода *Fusarium*. Наиболее активным продуцентом аминопептидаз была культура штамма *Fusarium anguioides* MFG 108802.

Полученные данные позволяют предположить, что наибольшая активность нейтральных пептидаз может наблюдаться только у фитопатогенных штаммов микромицетов. Наличие трипсин-подобной активности у всех исследованных штаммов фитопатогенных грибов, возможно, указывает, что именно трипсин-подобные пептидазы имеют высокую функциональную значимость при фитопатогенезе и могут являться маркерами фитопатогенности микромицетов.

Ультраструктура зеленых микроводорослей рода *Parietochloris* и *Myrmezia*

Шибзухова Карина Ахмедовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

karina_shibzuhova@rambler.ru

В последние годы особый интерес для биотехнологии представляют штаммы зелёных микроводорослей (МВ), что обусловлено их высоким потенциалом в качестве сырья для фармацевтической, химической и пищевой промышленности и сельского хозяйства. Особую ценность этих МВ представляет накопление в биомассе эссенциальных для человека и животных полиненасыщенных жирных кислот, таких как арахидоновая, докозагексаеновая и эйкозапентаеновая, каротиноидов.

В коллекцию кафедры Санкт-Петербургским государственным университетом и Институтом биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН переданы штаммы зеленых МВ рр. *Parietochloris* и *Myrmezia* из разных эколого-географических зон. Работа посвящена изучению особенностей их тонкой организации с помощью методов электронной микроскопии (ТЭМ, СЭМ), для уточнения систематического положения полученных штаммов в связи с таксономической ревизией.

Альгологически чистые культуры получали, используя стандартные микробиологические методы. Для изучения особенностей строения поверхности клеток зафиксированный по стандартной методике материал изучали с помощью сканирующего микроскопа JSM-6380LA (JEOL). Ультратонкие срезы клеток МВ после фиксации глутаровым альдегидом (2%) с постфиксацией OsO₄ (1%) исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011.

Проведенные исследования показали, что клетки МВ р. *Parietochloris* имеют округлую форму. Толстая клеточная стенка (0,5-0,7 μm) обладает неровной поверхностью. Пластидом представлен несколькими хлоропластами различной формы с хорошо развитой тилакоидной системой и крахмальными зёрнами (1-3 на срез). Имеется один крупный двускорлупчатый пиреноид. Основной объём клетки занимают многочисленные липидные глобулы. Вблизи хлоропластов иногда выявляются единичные мелкие митохондрии.

МВ р. *Myrmezia* отличается более тонкой клеточной стенкой (0,04-0,06 μm). Помимо одиночных клеток в культуре встречаются автоспорангии, которые имеют небольшой слизистый слой. Практически весь объём клетки занимают два крупных пристенных хлоропласта с хорошо развитыми тилакоидами и крахмальными зёрнами (1-6 на срез). Пиреноид в клетках отсутствует. Хондриом представлен крупными (0,4-0,6 μm) митохондриями с дисковидными кристами. В цитоплазме клеток встречаются отдельные липидные глобулы.

В результате проведенной работы с помощью методов электронной микроскопии получены новые данные, позволяющие уточнить систематическое положение двух штаммов.

Мониторинг агарикоидных базидиомицетов ельника приручьего

Шиигин Александр Сергеевич

*ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Россия, Пермь
shishigin1992@mail.ru*

Мониторинг агарикоидных базидиомицетов в лесных экосистемах позволяет проследить динамику изменения видового разнообразия, доминирующих видов (по числу и по биомассе базидиом) и состава эколого-трофических групп грибов.

В Пермском крае (подзона южной тайги) мониторинг грибов ведётся стационарным методом с 1975г. по настоящее время (1975–1977гг. – I период исследований; 1994–1996гг. – II период; 2010–2012гг. – III период) в 10 типах леса (пробные площади размером 50x20м). Материалом для данного сообщения послужили результаты изучения видового разнообразия, количества и биомассы плодовых тел грибов в ельнике приручьего, собираемых один раз в декаду в августе-сентябре 2010-2012гг. Список видов грибов расположен по системе, принятой М. Мозером (1983), что позволяет сравнить результаты III периода с данными I и II периодов.

В ельнике приручьего с 1975г. по настоящее время выявлено 285 видов агарикоидных базидиомицетов, относящихся к 4 порядкам, 16 семействам и 70 родам. Самыми распространенными по количеству видов являются сем. *Tricholomataceae*, *Cortinariaceae*, *Russulaceae*, что характерно для бореальной зоны. Наиболее крупные роды – *Mycena*, *Cortinarius*, *Russula*, *Lactarius*. В III период обнаружено 5 видов грибов, новых для Пермского края. В ельнике приручьего происходит некоторое изменение видового состава грибов. Так наименьший индекс общности по Жаккару ($J_{x100}=42$), вычисленный по видовому составу грибов, отмечен между I и III периодами. Если учесть, что мицелий грибов сохраняется в субстрате, а плодовые тела появляются не каждый сезон, тогда ко II периоду индекс общности равен 79, а к III периоду – 80. Количество доминантов (по биомассе, и по количеству базидиом) варьировало от 9 до 11 видов. Наименьший индекс общности доминантов по количеству базидиом был отмечен, между I и III периодом наблюдений ($J_{min}=31$), а по биомассе – между II и III периодом наблюдений ($J_{min}=7$).

Таким образом, видовой состав грибов между тремя периодами исследований варьировал незначительно, а с учетом мицелия – практически оставался неизменным. Состав видов, доминирующих по числу базидиом, особенно, по биомассе, подвержен большей трансформации, вплоть до полной их смены.

Выражаю благодарность научному руководителю д.б.н. проф. Переведенцевой Л.Г.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Штаммы *Bacillus sp.* с высокой фитазной активностью

Агабекян Инна Андрониковна, Трошагина Дарья Сергеевна

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, ИФМиБ, Россия, Казань
nuseq929@mail.ru

Фосфор является одним из основных минеральных элементов в питании прокариот и эукариот, составляя основу нуклеиновых кислот, фосфолипидов, молекул-энергоносителей. Однако большая часть почвенного фосфора представлена фитатом - недоступной для питания высших эукариот формой фосфорорганических соединений. Таким образом, учитывая снижающийся уровень доступных неорганических форм природного фосфата, проблема дефицита фосфора в питании растений и животных становится все более актуальной в мировом земледелии. Одним из путей решения проблемы является использование специфических ферментов фитаз микробного происхождения, способных расщеплять фитаты до легко усваиваемых остатков фосфорной кислоты и мио-инозитола. Щелочные β -Пропеллерные фитазы обладают высокой субстратной специфичностью и термостабильностью, что делает их наиболее перспективными для использования в различных направлениях биотехнологии.

Для продукции промышленных ферментов необходимо получение высокоэффективных штаммов-продуцентов. Использование дрожжевых систем экспрессии рекомбинантных белков является наиболее перспективным в связи с безопасностью их использования, а также быстрым ростом и высоким уровнем экспрессии. Кроме того, дрожжевые системы позволяют получать целевые белки, секретируемые в среду, что облегчает процесс очистки.

Целью работы является поиск и отбор штаммов *Bacillus sp.* с высокой фитазной активностью. В ходе работы проводили селекцию фитат-гидролизующих штаммов микроорганизмов на фитат-содержащей среде PSM (Phytase Screening Medium). Штаммы были выделены из ризосферы картофеля, предоставленного Татарским Научно-исследовательским Институтом сельского хозяйства. Из 9 штаммов, наибольшую способность к гидролизу фитата в среде показали штаммы *Bacillus subtilis* №4, *Bacillus altitudinis* и *Bacillus ginsengihumi*. Динамику роста и фитазной активности отобранных штаммов проводили в течение 72 часов. Наибольшая фитазная активность по отношению к фитату соответствовала 22, 20 и 22 часам роста, соответственно, и составила 0.403, 0.021, 0.199 U/mg.

Таким образом, нами отобраны три штамма *Bacillus sp.*, экспрессирующих активные фитазы. Дальнейшее изучение свойств данных штаммов и продуцируемых ими ферментов позволит отобрать наиболее перспективные фитазы для последующего клонирования ферментов и создания высокоактивных экспрессионных систем на основе дрожжевых клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-14-00114.

**Антибиотикорезистентность пробиотических лактобацилл:
генетические детерминанты и их реализация**

**Анисимова Елизавета Алексеевна, Бруслик Н.Л., Ахатова Д.Р., Исмагилова Р.К.,
Тойменцева А.А., Яруллина Д.Р.**

*Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Россия, Казань
elizaveta-real@mail.ru*

Устойчивость к антибиотикам - важное требование к пробиотическим штаммам, так как только устойчивые к антибактериальным препаратам бактерии можно совмещать с антимикробной терапией при лечении кишечных инфекций или применять для профилактики антибиотикоассоциированной диареи. Однако существует риск распространения локализованных на плазидах и конъюгативных транспозонах генов антибиотикорезистентности внутри кишечной микрофлоры, что противоречит требованиям лекарственной безопасности пробиотиков. Целью данной работы является выявление и характеристика генетических детерминант антибиотикорезистентности у потенциально пробиотических штаммов лактобацилл.

Из кисломолочных продуктов, пробиотиков и фекалий человека было выделено 34 штамма лактобацилл и методом MALDI TOF масс-спектрометрии установлена их видовая принадлежность. Диско-диффузионным методом оценена устойчивость исследуемых микроорганизмов к клинически распространенным антибактериальным препаратам девяти различных классов. Поскольку гены устойчивости к эритромицину (Erm) и тетрациклину (Tet) особенно подвержены горизонтальному транспорту, в геномах устойчивых к Erm и Tet бактерий с помощью секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК было проверено наличие 15 генов, кодирующих устойчивость к данным антибактериальным препаратам.

У лактобацилл обнаружена высокая устойчивость к ципрофлоксацину, ванкомицину и аминогликозидам. У одного штамма обнаружена резистентность к Erm и у пяти штаммов – к Tet. Молекулярно-биологический анализ данных микроорганизмов позволил обнаружить в их геномной ДНК гены *ermB* и *ermA* и ряд генов (*tetM*, *tetK*, *ermA*, *ermC*, *mefA*) - в плазмидной ДНК. У некоторых штаммов, не проявляющих устойчивость к Erm, выявлены молчащие гены *ermA*, *ermC* и *mefA*. Преимущественная локализация генов антибиотикорезистентности на плазмидной ДНК создает опасность распространения этих генетических детерминант в микробиоме человека, поэтому планируется оценить возможность горизонтального транспорта генов антибиотикорезистентности от лактобацилл к условно-патогенным бактериям гастроинтестинальной микрофлоры человека. Подготовленная нами база обладает большим потенциалом практического использования в биомедицине для создания пробиотических препаратов нового поколения, соответствующих самым строгим требованиям безопасности.

Выделение и идентификация молочнокислых бактерий из растительных субстратов

Барейко Анна Александровна

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, Минск
ganachka@mail.ru*

В связи с широким распространением у населения развитых стран аллергии на компоненты молока и молочных продуктов, в настоящее время остро стоит вопрос о замене их низкоаллергенными аналогами на основе растительного сырья, обладающими схожими органолептическими и функциональными свойствами. Молочнокислые бактерии, выделенные из кисломолочных продуктов, плохо сбраживают растительные субстраты, что актуализирует потребность в поиске в растительном материале перспективных заквасочных культур для ферментации растительных аналогов молока.

Из свежих и ферментированных овощей (огурец, капуста, баклажан), злаков (пшеница, рис), бобовых (соя) изолировано 38 чистых культур молочнокислых бактерий. Изучены морфологические и физиолого-биохимические свойства выделенных культур. Для 20 изолятов проведена идентификация с помощью анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и белковых профилей методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. На основании полученных результатов 2 культуры отнесены к роду *Lactococcus*, 4 культуры – *Enterococcus*, 1 культура – *Pediococcus*, 4 культуры – *Leuconostoc*, 9 культур – *Lactobacillus*. Выделенные культуры лактококков являлись представителями вида *Lactococcus garviae* (2), лейконостоков – *Leuconostoc mesenteroides* (4), педиококков – *Pediococcus pentosaceus* (1), энтерококков – *Enterococcus durans* (4), лактобацилл – *Lactobacillus brevis* (1), *Lactobacillus plantarum* (4), *Lactobacillus rhamnosus* (4).

Среди исследуемых растительных субстратов наибольшим видовым разнообразием молочнокислых бактерий характеризовались образцы квашеной капусты, в которых обнаруживались представители родов *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*. Наименее разнообразными по таксономическому составу молочнокислых бактерий оказались образцы ферментированных пророщенных зерен пшеницы и рисовой закваски, в которых выявлены только представители рода *Enterococcus*. Полученные результаты согласуются со сведениями литературы о таксономическом составе микроорганизмов, обитающих в сброженном растительном материале.

В дальнейшем предполагается изучить технологически важные свойства идентифицированных культур молочнокислых бактерий и отобрать штаммы, перспективные для использования в пищевой промышленности.

Отдельную благодарность за помощь в работе автор выражает своему научному руководителю, заведующей лабораторией “Коллекция микроорганизмов”, к.б.н. Новик Галине Ивановне, а также ст.н.с. лаборатории “Коллекция микроорганизмов” Сидоренко Анастасии Вячеславовне.

**Поиск геномных детерминант бинарного деления *Tepidisphaera mucosa*,
представителя нового порядка филума *Planctomycetes***

М.А. Гоева, А.А. Корженков, Н.И. Самаров

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта»,
Россия, Калининград
lionsorciere@gmail.com

Планктомицеты – необычная группа микроорганизмов, занимающая, обособленное положение на древе жизни и характеризующаяся большим разнообразием молекулярных клеточных механизмов, таких как деление почкованием и отсутствие нормального пептидогликана в клеточных стенках, которые отличают их от большинства бактерий. Однако повсеместность данных свойств среди представителей *Planctomycetes* была опровергнута в ряде недавних работ. Так, один из представителей филума *Planctomycetes*, *Tepidisphaera mucosa*, выделенная в 2014 году группой российских исследователей из ИНМИ РАН из наземных горячих источников Камчатки и Байкальской рифтовой зоны, по ряду признаков отличается от большинства культивируемых планктомицетов. Этот организм стал первым описанным представителем нового порядка *Tepidisphaerales* внутри класса *Phycisphaerae*, все три (включая *T. mucosa*) культивируемых представителя которого делятся бинарным делением. Помимо этого, *T. mucosa* является одним из первых представителей термофильных, а также факультативно анаэробных планктомицетов.

Для более полного понимания физиологии данного микроорганизма, в частности молекулярных механизмов его деления, нами была определена полная последовательность генома *T. mucosa*. Полученные при помощи системы MiSeq (Illumina) последовательности, были собраны в девять контигов. Для определения их ориентации относительно друг друга (скаффолдинга) было подобрано 26 праймеров к концам контигов и проведена ПЦР с данными праймерами и геномной ДНК. Было получено 11 специфичных ПЦР-продуктов, просеквенированных методом Сэнгера. В результате установлена взаимная ориентация контигов и собрана кольцевая молекула ДНК бактерии длиной 3,4 миллиона п.н.

Автоматическая аннотация полученной последовательности генома при помощи сервера RAST показала, что геном содержит 3281 белок-кодирующий ген, 47 тРНК и рРНК.

В геноме были найдены все гены *dcw*-оперона, о продукты которого ответственного за клеточное деление и синтез пептидогликана, за исключением ключевого белка *FtsZ*, участвующего в формировании *Z*-кольца при бинарном делении. В геноме *T. mucosa* не было найдено генов *FtsZ*-подобных белков и негомологичных тубулину GTP-связывающих белков, которые также могли бы участвовать в формировании *Z*-кольца. Однако, был найден гомолог эукариотического актина, кодируемый геном *MreB*, а также белки *MreC* и *MreD*. Основная охарактеризованная функция кодируемых ими белков *MreBCD* – участие в поддержании палочковидной формы бактериальной клетки. Сферическая форма *T. mucosa* позволяет предположить, что белки *MreBCD* у этого организма выполняют другую функцию. Поскольку процесс бинарного деления с участием белков *MreBCD* описан для некоторых представителей филума *Chlamydiae*, которые являются одной из наиболее близких к планктомицетам группой микроорганизмов, можно предположить, что и в основе деления *T. mucosa* лежит сходный механизм.

Автор выражает благодарность за помощь в работе своему научному руководителю к.б.н. Тошакову Степану Владимировичу.

Изучение антибиотических свойств бактерий, выделенных из плодовых тел базидиальных грибов

Ефименко Татьяна Александровна

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков

имени Г.Ф. Гаузе, Россия, Москва

efimen@inbox.ru

Интенсивное применение антибиотиков привело к тому, что многие штаммы болезнетворных микроорганизмов выработали устойчивость к известным антибиотикам. Одним из решений этой проблемы является поиск новых природных антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость бактерий.

Объектами исследования являются штаммы бактерий, выделенные из плодовых тел базидиальных грибов (базидиом) в качестве устойчивых контаминантов. Для определения антибиотической активности штаммов-продуцентов использовали 11 тест-организмов, в том числе *Leuconostoc mesenteroides* VKPM В-4177 (высокий уровень устойчивости к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина – VRLM), *Staphylococcus aureus* INA 00761 (высокий уровень устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, MRSA).

Выделено 93 бактериальных штамма, из которых 79 (85%) в условиях глубинного культивирования образуют антибиотики. У 36 штаммов обнаружена антибиотическая активность в отношении резистентных форм тест-бактерий: 31 штамм проявляет активность в отношении MRSA, 5 штаммов – в отношении VRLM. Проведенный анализ ДНК гена 16S рРНК 28 штаммов показал, что они относятся к 7 семействам бактерий: *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Moraxellaceae*. Два штамма ИНА 01085 и ИНА 01086 были отнесены к виду *Bacillus subtilis* на основании морфо-физиологических и генетических данных и выбраны для химического изучения. Установлено, что оба штамма образуют олигопептидные антибиотики массой 2059 и 1505 Да, соответственно, эффективные в отношении грамположительных тест-культур. Различие в составе антибиотиков заключается в наличии двух неидентифицированных небелковых аминокислот у штамма ИНА 01085. Кроме того обнаружено незначительное количество гексаена и пентаена, обладающих противогрибковой активностью.

Базидиомы являются перспективным источником бактерий – продуцентов антибиотиков, преодолевающих устойчивость болезнетворных бактерий. Выделение двух штаммов – продуцентов близких по структуре пептидов из единого источника, свидетельствует о высокой биосинтетической способности вида *B. subtilis* и вариабельности по признаку антибиотикообразования. Описанные пептидные антибиотики относятся к ранее неизвестным природным соединениям. Важным свойством этих антибиотиков является эффективность в отношении бактерий, устойчивых к антибиотикам бета-лактамой и гликопептидной природы.

**Влияние разлива реки на микробиологические показатели
внутригородского водоема**

Замятина Татьяна Ивановна

*Сургутский государственный университет, Институт Естественных и
Технических Наук, Россия, Сургут
tatianaioanovna@gmail.com*

Река Сайма, расположенная на территории города Сургут, является излюбленным местом отдыха горожан. В начале лета 2015 года произошли изменения в её режиме в связи с разливом реки Оби и большая часть водохранилища оказалась затопленной. Такое явление вносит изменения в состав микрофлоры реки, т.к. микроорганизмы почвы прилегающих территорий вымываются в основной объем воды.

Пробы воды отбирались батометром с 8 точек реки Сайма с мая по сентябрь 2015 года. Производился микробиологический посев водных образцов на питательные среды: МПА - для определения ОМЧ, Мюнца - для изучения литоавтотрофов и Кинга для учета углеводородоксилирующей микрофлоры с дальнейшим подсчетом колоний и идентификацией доминирующей микрофлоры.

В результате исследования выявлены колебания численности микроорганизмов разных групп. Май характеризуется преобладанием сапрофитной гетеротрофной микрофлоры, численность которой составляет 1,48-120,9 тыс.КОЕ/мл, численность углеводородоксилирующей микрофлоры составляет 0,09-23,06 тыс.КОЕ/мл, литоавтотрофов - 0,56-8,87 тыс.КОЕ/мл. В июне из-за разлива реки и высокой температуры резко возрастают показатели ОМЧ (1053,8 тыс.КОЕ/мл), преобладающее над другими группами микроорганизмов во всех точках отбора. В июле этот показатель составляет 2200,2 тыс.КОЕ/мл. В августе ОМЧ снижается (13,7-819,8 тыс.КОЕ/мл), а в точках отбора №2,4,5,6, повышается численность углеводородоксилирующей (119,8-418,7 тыс.КОЕ/мл). Наряду с этим изменяется численность литоавтотрофов (165,89 тыс.КОЕ/мл) в сравнении с исходными показателями. В сентябре снижается численность всех групп микроорганизмов, но в некоторых точках отбора число углеводородоксилирующей микрофлоры повышается, составляя 2,65-1423,4 тыс.КОЕ/мл. Доминирующая микрофлора представлена: бактериями родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Deinococcus*, *Aeromonas*, *Xanthobacter*, *Aminobacter*, плесневыми грибами родов *Penicillium* и *Cladosporium*, и дрожжами *Cryptococcus albidus*.

Анализируя полученные данные, можно сказать, что разлив реки значительно влияет на численность и количественное соотношение микроорганизмов разных групп. Наряду с этим влияние оказывает температура и активная кислотность. Повышение числа литоавтотрофов говорит о процессах минерализации в водоеме, а увеличение числа углеводородоксилирующей микрофлоры свидетельствует о процессах разложения микроорганизмами нефтепродуктов.

Встречаемость и генетическое разнообразие риккетсий, выявленных в клещах на территории России

Карташов Михаил Юрьевич

Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

kartashov_myu@vector.nsc.ru

Риккетсиозы представляют собой постоянно расширяющуюся группу инфекционных заболеваний, возбудители которых в большинстве случаев передаются человеку иксодовыми клещами. Изучение спектра циркулирующих на территории России риккетсий является актуальной задачей и имеет огромное значение для совершенствования диагностики клещевых риккетсиозов.

В исследование было взято более 3100 клещей различных видов, отловленных с растительности или снятых с людей на территории Новосибирской, Томской областей, Республики Коми и Республики Крым. Скрининг клещей на наличие генетических маркеров риккетсий проводили с помощью ПЦР-РВ с использованием пары праймеров и зонда, специально разработанных нами для этой цели. Генотипирование выявленных изолятов риккетсий было проведено путем определения полноразмерных нуклеотидных последовательностей генов *gltA* и *ompB*.

За период наблюдения 2010-2015 гг. суммарный уровень инфицированности риккетсиями клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* колебался от 8,7 % до 21,1 %. Все выявленные изоляты риккетсий были отнесены к *Candidatus R. tarasevichiae*. В клещах рода *Dermacentor*, отловленных в пригородах г. Томска, уровень инфицированности превысил 35 %, выявленные изоляты типированы как *R. raoultii*. Генотипирование риккетсий в Новосибирской области показало, что клещи рода *Ixodes* в подавляющем числе случаев инфицированы *Candidatus R. tarasevichiae*, однако от двух клещей *I. persulcatus* была изолирована ДНК *R. helvetica*; клещи рода *Dermacentor* инфицированы *R. raoultii* и гораздо реже *R. sibirica*. Инфицированность риккетсиями клещей *I. persulcatus*, отловленных в Республике Коми, составила 7,6 %; 39,2 % выявленных изолятов были типированы как *Candidatus R. tarasevichiae*, остальные как *R. helvetica*. В клещах *D. marginatus*, отловленных на территории Крыма, выявлен генетический материал *R. raoultii*; в клещах *H. marginatum* обнаружен генетический материал *R. aeschlimanii*, а в клещах *H. punctata* – *R. monacensis*.

Результаты исследования подтверждают широкую распространенность и разнообразный видовой состав риккетсий, циркулирующий в клещах на обследуемых территориях, что указывает на необходимость проведения мониторинга природных очагов риккетсиозов и совершенствования существующих методов дифференциальной диагностики этих инфекций.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00425.

Оценка биотехнологического потенциала штаммов микроорганизмов, активных в отношении углеводов нефти

Князюк Маргарита Константиновна, Ламова Яна Александровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

knyazyukmargarita@mail.ru

Разработка микробных биопрепаратов для утилизации нефтяных загрязнений является одним из перспективных направлений в области биотехнологии. Расширение

индустрии нефтедобычи в арктическом регионе увеличивает интерес к данной теме, а также требует разработки новых препаратов, которые бы работали в условиях низких температур. Микробная утилизация нефтепродуктов микроорганизмами является многостадийным процессом, важными этапами которого являются продукция биосурфактантов и биodeградация углеводов до более простых соединений.

В рамках данной работы было проанализировано сообщество микроорганизмов (Nsk1), активных в отношении углеводов нефти. Методом газо-жидкостной хроматографии была проведена оценка убыли углеводов (смесь товарной нефти и дизельного топлива в соотношении 1:1 – далее НД) в среде культивирования в условиях низких температур (+4°C). Кроме того, из анализируемого сообщества были выделены чистые культуры микроорганизмов, среди которых в дальнейшем были отобраны наиболее активные штаммы посредством аппликации фильтра, смоченного НД (критерием отбора культур являлось просветление фильтра на месте роста колонии). В результате было выделено 2 активных в отношении нефти штамма микроорганизмов: *Nocardia coeliaca* RT и *Nocardia coeliaca* YN. Для каждой культуры было проведено исследование биосурфактантной активности и деградации углеводов нефти. Для этого определяли индекс эмульгирования (E_{24} ,%) в культуральной жидкости и супернатанте и проводили хроматографическую оценку убыли нефти.

В результате оценки биосурфактантной активности были получены значения E_{24} для исследуемых культур, которые составили 57% и 53% в культуральной жидкости для *N. coeliaca* RT и *N. coeliaca* YN соответственно, и 0% в супернатанте для обеих культур. Биоэмульгирующая активность наблюдалась только в культуральной жидкости, что позволяет сделать вывод о наличии биосурфактантов, связанных с поверхностью клеток, что характерно для Грам+ бактерий. Полученные высокие значения могут свидетельствовать о приспособленности данных штаммов к росту на среде с гидрофобными субстратами, что является важным критерием при отборе микроорганизмов. В результате хроматографической оценки была определена суммарная убыль углеводов на 20-ые сутки культивирования: для *N. coeliaca* RT -23%, для *N. coeliaca* YN - 42%. При этом, для обеих культур наблюдалась более интенсивная деградация среднекипящей фракции. Значения пристан-фитанового индекса (показателя микробной деградации углеводов) оказались выше для штамма *N. coeliaca* YN, что говорит о более высокой, по сравнению со вторым штаммом, способности к окислению углеводов нефти.

Исследуемые штаммы микроорганизмов, проявляющие высокую степень деградации углеводов, могут быть использованы в составе биопрепарата для очистки нефтяных загрязнений. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение их биотехнологического потенциала и составление биопрепарата на основе наиболее активных микроорганизмов.

**Филогенетическое разнообразие микробных сообществ метановых
высачиваний дна Юго-восточной части Балтийского моря**

**Корженков Алексей Александрович, Самаров Назар Игоревич,
Гоева Маргарита Андреевна**

*Балтийский Федеральный Университет имени И. Канта, Россия, Калининград
oscypek@ya.ru*

Восстановленные газонасыщенные осадки, характерные для покмарков (газовых кратеров), способствуют формированию уникальных микробных консорциумов метанотрофных архей и бактерий, обеспечивающих процессы трансформации метана в анаэробных условиях. В ходе исследования в Российском секторе Юго-восточной части Балтийского моря были отобраны образцы донных осадков покмарка и типового морского дна. Из полученных образцов была выделена тотальная ДНК, созданы библиотеки для высокопроизводительного секвенирования гипервариабельного участка V4 гена 16S рРНК. Полученные данные были проанализированы при помощи пакета QIIME с использованием базы данных Silva119.

Результаты анализа показали, что в горизонтах 0-15 см донных осадков наибольшую долю (до 43,7%) составляет филум протеобактерий, в основном дельта- и гаммапротеобактерии. Широко представлены на всех горизонтах бактерии филума *Planctomycetes* и эуриархеи *Halobacteria* и *Thermoplasmata*, филум *Thaumarchaeota*, наряду с археями неясной филогении. В верхних горизонтах осадков покмарка в значительно большем количестве, по сравнению с типовым сообществом представлены *Bacilli*, *Chlamydiae*, *Cyanobacteria*, *Flavobacteriia*, *Tenericutes*. На глубине 18-37 см в покмарке представлены анаэробные метанотрофные археи порядка *Methanosarcinales* ANME-2a-2b (до 1,1%), на более глубоких горизонтах представлены археи групп ANME-1b (45-280 см, до 3,0%) и ANME-1a (75-280 см, около 0,1%). В образцах покмарка в большей доле (до 0,7%) по сравнению с типовыми осадками (до 0,1%) найдены представители бактериального филума *Parcubacteria*. Эти бактерии ведут симбиотический образ жизни в бескислородных водных местообитаниях, характеризуются малым размером генома и утратой многих генов, ответственных за синтез жизненно важных соединений.

Таким образом, микробные местообитания в местах высачивания метана Юго-восточной Балтики характеризуются высоким филогенетическим разнообразием. В исследованных сообществах представлены три группы анаэробных метанотрофов, специфичных для этих местообитаний, а также организмы, участвующие в процессах восстановления неорганических соединений. В исследованных осадочных отложениях высоко разнообразие типичных представителей анаэробного сообщества микроорганизмов, обеспечивающих разложение органического вещества.

Автор выражает благодарность за научное руководство С.В. Тоцакову (БФУ им. И. Канта), Н.В. Пименову (ФИЦ ФОб РАН), В.В. Сивкову (АО ИО РАН), помощь в пробоотборе Т.А. Канапацкому (ФИЦ ФОб РАН) и М.О. Ульяновой (АО ИО РАН).

Долговременное хранение пурпурной серной бактерии

Thiocapsa roseopersicina BBS

Кошкарова Лилия Андреевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

Liliyakoshkarova@mail.ru

Методы длительного хранения микроорганизмов изучают с момента становления микробиологии как науки. В целом, методы долговременного хранения микроорганизмов позволяют снизить риск контаминации культур и потери активности клеток, уменьшают вероятность возникновения значительных генетических перестроек и снижают затраты времени и труда исследователей на постоянный пересев культур. В работе выбрали два метода для долговременного хранения пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS: лиофилизацию и хранение при низких температурах (-80°C).

При замораживании в качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5%. Для оценки вклада ДМСО в сохранении жизнеспособности клеток часть проб криопротектор не добавляли. До замораживания исходно количество жизнеспособных клеток составляло $5,2 \cdot 10^{10}$ клеток на мл, а после инкубирования с ДМСО снизилось до $3,3 \cdot 10^{10}$, таким образом, ДМСО незначительно снижал титр. В тоже время после замораживания количество жизнеспособных клеток не изменилось в образцах с 5% ДМСО и снизилось до $6,7 \cdot 10^9$ КОЕ на мл в образцах без криопротектора. Через полгода хранения при -80°C концентрация жизнеспособных клеток составила $1,1 \cdot 10^{10}$ и $1,4 \cdot 10^9$ КОЕ на мл для образцов с 5% ДМСО и без него соответственно.

При лиофилизации в качестве защитной среды использовали 10% сухое обезжиренное молоко с 7,5% сахарозой, культуру лиофилизировали в стеклянных ампулах, которые после процесса сублимации запаивали под вакуумом. После процесса лиофилизации концентрация жизнеспособных клеток снизилась менее чем на порядок с $11 \cdot 10^8$ до $2 \cdot 10^8$ клеток на миллилитр. При хранении ампул при 4°C через год титр упал до $6,5 \cdot 10^7$ клеток на мл.

Хотелось бы отметить, что хотя лиофилизация широко используется и оптимальные условия подобраны для большого количества культур, для сохранения аноксигенных фототрофных микроорганизмов многими авторами данный метод не рекомендуется. И даже если ряд лабораторий использует в своей практике лиофилизацию для хранения фототрофов, то в литературе данных по данному вопросу крайне мало. В работе было показано, что оба исследованных метода применимы для долговременного хранения пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS. В дальнейшем подбор оптимальных защитных сред позволит увеличить сроки хранения культуры.

Характеристика ризосферных бактерий *Pseudomonas* sp. MG 1

Лутфуллин Марат Тафкилевич, Мочалова Наиля Касимовна

Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Россия, Казань

lutfullin.marat2012@yandex.ru

Использование в сельском хозяйстве биопрепаратов, созданных на основе микроорганизмов стимулирующих рост растений, является одним из приёмов, способствующих повышению урожая. Среди ассоциативных микроорганизмов одной из наиболее перспективных групп бактерий являются ризосферные бактерии рода

Pseudomonas. Они колонизируют корни и стимулируют рост растений за счет различных механизмов: увеличение количества доступного фосфора, фиксация атмосферного азота, синтез фитогормонов и др.

Целью работы было выделение и характеристика ризосферных бактерий с ростостимулирующей активностью. Штаммы бактерий выделяли из ризосферы картофеля. Идентификацию штамма проводили с помощью MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). Для обнаружения и количественного определения индолил-3-уксусной кислоты использовали реактив Сальковского. Бактерии культивировали на среде LB, содержащий L – триптофан (0,3 мг/мл), при 30°C. Фосфатмобилизующую активность изучали на среде Пиковской, с добавлением 0,5% ортофосфата кальция. Для выявления способности фиксировать атмосферный азот использовали агаризованную среду Эшби без содержания азота.

Из ризосферы картофеля было выделено 5 изолятов бактерий, из которых один штамм обладал способностью к синтезу индолил-3-уксусной кислоты. На основе MALDI анализа и исследований морфологических свойств данный штамм был идентифицирован как *Pseudomonas* sp. Исследование динамики синтеза ИУК бактериями *Pseudomonas* sp. MG 1 показало, что максимальное количество фитогормона синтезируется на 3 сутки на среде LB с триптофаном и достигает 125 мкг/мл, без триптофана 35 мкг/мл, что свидетельствует о триптофан-зависимом синтезе данного фитогормона. При культивировании бактерий на среде Пиковской на десятые сутки вокруг колонии образуется зона просветления, что свидетельствует о фосфат-мобилизующей активности данного штамма. Бактерии способны к интенсивному росту на среде Эшби, что свидетельствует о способности фиксировать атмосферный азот.

Таким образом, штамм ризосферных бактерий *Pseudomonas* sp. MG 1 обладает способностью к синтезу фитогормона ИУК, мобилизации фосфата и способностью к фиксации атмосферного азота, что свидетельствует о ростостимулирующей активности выделенных бактерий и может быть использован в агробιοтехнологии для разработки биопрепаратов, повышающих продуктивность растений.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83).

Изучение эффекта синергизма между вирусным и бактериальным агентами при борьбе с непарным шелкопрядом (*Lymantria dispar* L.)

Охлопкова Олеся Викторовна, Моисеева Анастасия Алексеевна

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия,

Новосибирская обл., р. п. Кольцово

ohlopkova_ov@vector.nsc.ru, chalaya_aa@vector.nsc.ru

Важной характеристикой бактериальных инсектицидов является высокая скорость воздействия на насекомых-вредителей. Однако существует сложность, которая заключается в асинхронности индивидуального развития вредителей. Это неизбежно влечет за собой многократные обработки посевов и лесных массивов, что не приемлемо с точки зрения экономики и экологии. Оптимизация состава препарата и снижение его расхода при сохранении высокой эффективности позволит больше соответствовать современным экологическим требованиям. Одно из решений данной проблемы - создание комплексных средств защиты растений, основанных на эффекте синергизма.

Целью исследования являлось изучение возможности повышения эффективности от совместного применения биопрепарата «Лепидоцид» и изолята вируса ядерного полиэдроза (ВЯП НШ) против непарного шелкопряда.

Объектами исследования послужили инфекционные агенты – изолят ВЯП НШ (ГНЦ ВБ «Вектор»), биопрепарат «Лепидоцид» на основе *Bacillus thuringiensis* (ООО ПО «Сиббиофарм»). В качестве индикатора эффективности использовалась популяция гусениц непарного шелкопряда 2-3 возрастов. Применялась методика лабораторного культивирования гусениц при алиментарном способе заражения, наличие действующих агентов в погибших гусеницах определялась микроскопическим методом.

Результатами послужили рассчитанные значения показателя ЛВ50 (летальное время (в сутках), за которое погибает 50% гусениц) при заражении исследуемыми инфекционными агентами разных концентраций. ЛВ50 при заражении ВЯП НШ с концентрацией 10^6 пэ/мл составило $11,6 \pm 0,3$ суток, с концентрацией 10^7 пэ/мл – $9,8 \pm 0,1$ суток, 10^8 пэ/мл – $8,5 \pm 1,3$ суток. Для «Лепидоцида» также был рассчитан данный показатель. При заражении концентрацией 6×10^9 спор/мл ЛВ50 = $1,7 \pm 0,3$ суток, 6×10^8 спор/мл – $3,8 \pm 0,7$ суток, 6×10^7 спор/мл – $4,9 \pm 0,8$ суток. Для смеси ВЯП НШ (концентрация 10^6 пэ/мл) и «Лепидоцида» (концентрация 6×10^7 спор/мл) показатель ЛВ50 составил $1,5 \pm 0,2$ суток.

В результате исследования было установлено, что совместное применение биопрепарата «Лепидоцид» и изолята ВЯП НШ является обоснованным. По показателю ЛВ50 эффективность возросла за счет их смешанного использования. Показатель ЛВ50 для смеси близок по значению к ЛВ50 для «Лепидоцида» с самой высокой концентрацией – $1,5 \pm 0,2$ суток и $1,7 \pm 0,3$ суток соответственно. Это подтверждает наличие синергизма между исследуемыми бактериальным и вирусным агентами. Также вирусный агент способствует пролонгированному действию бактериального препарата, что является крайне выгодным с экономической стороны.

**Изучение биологического действия культуральной жидкости
бактерии *Pseudomonas aeruginosa*
Пальчевская Екатерина Сергеевна**

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
институт физики высоких технологий, Россия, Томск
palchevskaya.kat@mail.ru*

Для обеспечения эффективного возделывания сельскохозяйственных культур и сохранности урожая следует совершенствовать средства защиты растений. Применение микробиологических препаратов позволит реализовать почвенно-климатический потенциал агроландшафта, а также биологический потенциал сельскохозяйственных растений. Перспективными естественными антагонистами фитопатогенных грибов и бактерий являются бактерии рода *Pseudomonas*, синтезирующие антибиотики ароматической природы, подавляющие развитие фитопатогенов. В состав синтезируемых соединений входят феназины, проявляющие высокую активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также грибов.

Цель работы: изучить биологическое действие культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, штамм 67.

Получение биомассы микроорганизмов осуществляли путём периодического культивирования бактерии на среде Кинг Б при температуре 37 °С, с аэрацией, в течение 5 суток. Экстракцию феназинов проводили по оригинальной методике, разработанной в ходе исследований. Определение антимикробного действия культуральной жидкости *P. aeruginosa*, штамм 67 и полученных феназинов по отношению к ряду тест-организмов проводилось методом последовательных разведений.

В результате работы были выделены следующие соединения феназинового ряда от бактерии *P. aeruginosa*, штамм 67: феназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин, 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота, пиоцианин. Разделение и очистка феназиновых соединений осуществлялись методами тонкослойной и колоночной хроматографии. Установление структур полученных соединений проводили при помощи УФ-спектрофотометрии, ЯМР спектроскопии и измерением температур плавления.

Изучено биологическое действие культуральной жидкости бактерии *P. aeruginosa*, штамм 67 и феназинов на ряд тест-организмов: *E.coli*, *S.aureus*, *B.subtilis*. Выявлены бактерицидная и бактериостатическая феназин-1-карбоновой кислоты по отношению к тест-организмам.

Установлено, что культуральная жидкость *P.aeruginosa*, штамм 67 проявляет антибиотическую активность по отношению ко всем тест-культурам. Доказано, что бактерицидное действие культуральной жидкости обусловлено присутствием в ней антибиотиков феназинового ряда. После экстракции феназиновых соединений антибиотическое действие культуральной жидкости отсутствует. Чистые антибиотики феназинового ряда проявляют несколько меньшую антибиотическую активность по отношению к тест-организмам, из чего можно сделать вывод, что антибактериальное действие культуральной жидкости *P. aeruginosa*, штамм 67 также обусловлено наличием других биологических соединений.

Оптимизация микробиологического синтеза такролимуса

актинобактериями рода *Streptomyces*

Пошехонцева Вероника Юрьевна

Пуцинский государственный естественно-научный институт, Россия, Пуцино

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН,

Россия, Пуцино

rikahameleon@mail.ru

Такролимус (FK-506) – продуцируемый различными видами *Streptomyces* макроциклический поликетид с мощным иммуносупрессорным действием, нашедший широкое применение в трансплантологии, дерматологии, при лечении аутоиммунных заболеваний и т.д. Основным недостатком существующих технологий микробиологического синтеза такролимуса является низкий уровень биосинтетической активности штаммов, ее нестабильность у большинства продуцентов, их выраженная диссоциация и фенотипическая изменчивость. В связи с вышперечисленным, целью настоящего исследования являлась разработка и оптимизация метода микробиологического синтеза FK-506.

В работе использовали штамм *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д; селекцию морфотипов проводили на основе структуры колоний. Биосинтез вели в течение 10-14 суток, концентрацию такролимуса оценивали методом ВЭЖХ.

Отобран наиболее продуктивный в отношении такролимуса морфотип штамма *S. tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д, представленный интенсивно окрашенными колониями округлой формы с выраженной структурной дифференциацией поверхности. Оптимизированы условия культивирования на основе зависимости целевой биосинтетической активности от состава питательных сред и параметров инкубирования. Проанализирован широкий спектр источников углерода, азота, витаминов и микроэлементов. Обнаружено, что предпочтительным источником углерода является крахмал и продукты его частичного гидролиза, азота – кукурузный экстракт. Активный биосинтез наблюдался при добавлении в среду лиофилизированных пекарских дрожжей, показано стимулирующее действие солей марганца и ряда аминокислот. Для предотвращения деградации такролимуса культурой обязательно добавление в продуктивную среду сорбента. Оптимальными условиями культивирования являются температура 24-25°C, рН 6,8-7,5 и интенсивная аэрация.

Полученные данные были апробированы при проведении биопроцесса на уровне колб и лабораторных ферментеров с рабочим объемом 5 л. Достигнуто значительное содержание такролимуса, составившее свыше 500 мг/л. Результаты могут быть использованы при создании технологии процесса биосинтеза такролимуса на пилотном и опытно-промышленном уровнях.

Примечания: автор выражает благодарность научным руководителям к.б.н. Суходолькой Г.В. (микробиология), к.б.н. Гулевской С.А. (цитология), д.б.н. Доновой М.В. (общее руководство работой), ООО «Фарминс», г. Пущино Московской области (за предоставление штамма и финансовую поддержку исследования).

Сравнение методов длительного хранения микроорганизмов, активных в отношении нефти

Ромашин Даниил Дмитриевич, Сережкин Илья Николаевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

daniil.romashin@gmail.com

В настоящее время микробные биотехнологии находят широкое применение в промышленности. В связи с этим, проблема эффективной консервации микроорганизмов является актуальной. Основные методы непродолжительного хранения микроорганизмов непригодны для решения многих технологических и исследовательских задач. Несмотря на значимость методов непродолжительного хранения, для достижения большей эффективности и увеличения объемов консервируемой микробной биомассы используются более эффективные методы, такие как хранение при отрицательных температурах и лиофильное высушивание.

Целью работы было сравнение эффективности различных методов длительного сохранения культур микроорганизмов, активных в отношении нефти (криоконсервации и лиофильного высушивания). В качестве объектов исследования были выбраны 3 штамма микроорганизмов родов *Leucobacter* sp., *Psychrobacter* sp., *Nocardia* sp. При замораживании культур были использованы два криопротектора: р-р DMSO (5%) и р-р декстрана и глюкозы с концентрациями 8% и 7.5 % соответственно. В качестве контроля были заморожены образцы культуральной жидкости без криопротекторов. Оценка выживаемости микроорганизмов производилась путем посева на плотную питательную среду (Plate Count Agar) через неделю и через месяц после консервации. Снижение числа

КОЕ в мл замороженного материала наблюдалось только для штамма *Leucobacter* sp. без криопротектора (титр в мл суспензии снизился с 10^9 до 10^7 КОЕ/мл).

Указанные штаммы также были подвергнуты лиофилизации в стеклянных ампулах на установке для лиофильного высушивания при глубине вакуума 4.2 Па. В качестве защитной среды был использован раствор сухого обезжиренного молока с концентрацией 10%. Спустя неделю после высушивания, в ампулах было определено количество жизнеспособных клеток. Количество КОЕ в образцах для культуры *Leucobacter* sp. снизилось с 10^8 до 10^7 , для культуры *Nocardia* sp. – с 10^9 до 10^8 , для культуры *Psychrobacter* sp. – с 10^8 до 10^7 .

В ходе работы на примере 3 психрофильных штаммов было проведено сравнение двух методов долгосрочного хранения. Высокая выживаемость клеток доказала эффективность применения методов. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что данные штаммы могут быть использованы при разработке биопрепаратов для утилизации нефтяных загрязнений в условиях северных морей.

Поиск генов утилизации ксилана в геноме термофильной бактерии

Fervidobacterium riparium 1445^T

Самаров Н.И., Корженков А.А., Гоева М.А.

ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени И. Канта,

Россия, Калининград

nazar.sni@gmail.com

Растительная биомасса в основном состоит из лигнина, целлюлозы и гемицеллюлозы – комплекса полимерных углеводов, включающего ксилоглюкан, глюкоманнан, галактоманнан, арабиногалактан и ксилан. Утилизация последнего отличается наибольшей многоступенчатостью и значительным разнообразием вовлеченных ферментов, что, вероятно, может лимитировать скорость и/или способность разложения растительной биомассы микроорганизмами.

В 2011 году Подсокорская с коллегами описали новый вид термофильной бактерии *Fervidobacterium riparium* sp. nov. штамм 1445^T, являющийся первым наземным представителем филума *Thermotogae* и, конкретно рода *Fervidobacterium*, растущем на целлюлозе или ксилане в качестве единственного источника энергии и углерода.

Для того чтобы выявить генетические детерминанты способности типового штамма *F. riparium*, 1445^T, разлагать ксилан, нами была определена полная последовательность его генома, представленного одной кольцевой хромосомой длиной 2254323 нуклеотида без дополнительных внехромосомных элементов; геном содержит 2221 белок-кодирующий ген, 48 генов тРНК и 3 рибосомных оперона. Анализ *in silico* транслированных аминокислотных последовательностей показал наличие в геноме 41 гена, кодирующего гликозид гидролазы из 22 различных семейств (по CAZy), что может указывать на развитость систем утилизации полисахаридов. Из них белки, отвечающие за разложение ксилана и целлюлозы, наиболее вероятно могут относиться к семействам 3, 5, 16, 30, 94.

Также анализ генома *F. riparium* показал наличие ксилозного оперона, включающего гены, кодирующие β-1,4-ксилозидазу, отщепляющую D-ксилозу от нередуцирующего конца ксилоолигосахаридов, а также изомеразу ксилозы и киназу ксилулозы, в результате действия которых образуется D-ксилулозо-5-фосфат –

промежуточное звено пентозофосфатного цикла. Гомологи всех этих белков представлены в геномах других видов рода *Fervidobacterium*, однако, только в геноме *F. riparium* был обнаружен ген предполагаемой ацетилксилан эстеразы, катализирующей отщепление ацетильных групп от полимерного ксилана. Активность этого фермента особенно важна для гидролиза клеточной стенки покрытосеменных растений в виду высокой степени ацетилирования ксилана и может объяснять исключительную способность *F. riparium* расти на ксилане.

В ходе продолжения этих исследований планируется клонировать упомянутые ферменты в *E. coli*, выделить их и охарактеризовать ферментативную активность.

Автор выражает благодарность за научное руководство С.В. Тоцакову (БФУ им. И.Канта), а также И.В. Кубланову и О.А. Подосокорской (ФИЦ ФОБ РАН).

Поисковые исследования резервных штаммов, перспективных для разработки и создания средств специфической профилактики сибирской язвы

Севских Тимофей Александрович, Кулагина Светлана Петровна

*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии, Россия, п. Вольгинский
sefskih@mail.ru*

Во всем мире для иммунизации животных от сибирской язвы используются вакцины на основе живых спор искусственно или природно аттенуированных штаммов *Bacillus anthracis*. Используемый в настоящее время и хорошо зарекомендовавший себя за 27 лет использования вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ не является универсальным средством, что подтверждается спорадическими вспышками сибирской язвы среди иммунизированного скота и периодическим выделением эпизоотических штаммов, против которых существующая вакцина неэффективна. В связи с этим, становится актуальным проведение поисковых работ, направленных на изучение штаммов, перспективных для разработки средств профилактики сибиреязвенной инфекции.

На основании многолетних поисковых исследований, проводимых в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, в качестве резервного сибиреязвенного штамма был отобран естественно аттенуированный изолят 363/11, выделенный от подсвинка.

Изучение иммунобиологических свойств нового резервного штамма проводили общепринятым способом в соответствии с существующими нормативно-методическими документами. В качестве штаммов для сравнения использовали вакцинные штаммы российского происхождения – 55-ВНИИВВиМ, СТИ-1 и Шуя-15.

В результате сравнительного исследования иммунобиологических свойств штаммов было установлено, что вакцинные штаммы имеют низкий уровень ферментативной активности, не синтезируют пигмента - протокатеховой кислоты и не сорбируют пигмент из среды; изолят 363/11, напротив, имел высокий уровень продукции ферментов, сорбировал пигмент конго красный из среды и синтезировал пигмент. При проверке иммуногенности штаммы также продемонстрировали разный уровень защиты лабораторных животных против заражения капсульными вакцинными штаммами. Так, при заражении штаммом 17JB уровень защиты для 363/11 и СТИ-1 составлял 100%, в то время как для Шуя-15 и 55-ВНИИВВиМ он был, соответственно, на уровне 90% и 73%. Против штамма Carbovax штаммы СТИ-1 и Шуя-15 оказались неэффективны (58% и 36%), для штаммов 55-ВНИИВВиМ и 363/11 показатель защиты составлял 100% и 78%

соответственно. Для 363/11 был установлен показатель ИмД₅₀ в сравнении со штаммом 55-ВНИИВВиМ: против штаммов 71/12 и Carbovax – $2,95 \cdot 10^4$ и $1,55 \cdot 10^5$, что ниже показателей штамма 55-ВНИИВВиМ ($2,9-3,4 \cdot 10^5$ против 71/12).

Полученные данные свидетельствуют о том, что новый природно аттенуированный штамм 363/11 обладает свойствами, позволяющими рассматривать его в качестве резервного вакцинного штамма.

Носительство золотистого стафилококка у лиц некоторых сфер деятельности в условиях Севера

Селимова Регина Робертовна

*Сургутский государственный университет, Институт Естественных и
Технических Наук, Россия, Сургут
regi.regi.1994@mail.ru*

В настоящее время актуальность проблемы профилактики и этиологии стафилококковой инфекции сохраняется. Бактерионосительство золотистого стафилококка возможно при перестройке механизмов и звеньев иммунной системы. Создаются условия в макроорганизме для персистенции резидентных штаммов микроорганизма. Входными воротами инфекции могут быть слизистые дыхательных путей, микроповреждения кожи. *Staphylococcus aureus* способен вызвать воспалительный процесс практически в любом органе, при ослаблении иммунитета может быть причиной гнойно-воспалительных заболеваний.

Было проведено исследование на носительство золотистого стафилококка в различных группах лиц в зависимости от профессиональной деятельности. Обследовано 364 человека, среди которых 191 – сотрудники медицинских учреждений; 110 человек – работники продуктовых торговых центров; 63 – работники общественного питания.

Одним из удобных и быстрых методов мониторинга за стафилококковой инфекцией, еще не получившим масштабного распространения, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. В связи с этим нами изучалась частота носительства золотистого стафилококка методом ПЦР в различных группах лиц в зависимости от профессиональной деятельности одного из поселков Сургутского района.

В проведенных исследованиях было установлено, что золотистый стафилококк у медицинского персонала был выявлен в 30% случаев (58 чел.); у сотрудников продуктовых магазинов – 28 % случаев (31 чел.); у работников общественного питания носительство составило 25 % случаев (16 чел.).

Нами были выявлены чувствительные и резистентные к метициллину штаммы. Из них у медицинского персонала 52 (90%) человека являются носителями MRSA, а 6 (10%) человек – MSSA; среди сотрудников продуктовых магазинов 19 (61%) человек являются носителями метициллин-резистентных штаммов золотистого стафилококка, а 12 (39%) человек носителями метициллин-чувствительных штаммов; у работников общественного питания MRSA – 12 (75 %), MSSA – 4 (25 %).

В целом, частота встречаемости стафилококкового носительства у обследованных людей совпадает с литературными данными, однако частота встречаемости MRSA видов, по нашим данным, значительно выше, что является отрицательным прогнозом, свидетельствующим о возможности селекции и эпидемическому распространению. Таким образом, наибольший процент бактерионосительства *Staphylococcus aureus* выявлен среди

медицинского персонала. Это объясняется более тесным взаимодействием с больными, которые являются носителями данной инфекции.

**Реидентификация коллекционных штаммов бактерий рода *Geobacillus*
Смирнова Маргарита Викторовна¹, Ладутько Елена Ивановна¹,
Калинина Анна Николаевна²**

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

²ФГУП «ГосНИИгенетика», Россия, Москва
margarita10077@yandex.ru

Формирование и сохранение генетического фонда микроорганизмов имеет определяющее значение в развитии микробиологической науки и промышленности. Задача коллекционных фондов микроорганизмов по всему миру - способствовать развитию биотехнологии, биомедицины, сельского хозяйства и охраны окружающей среды путем предоставления аутентичного биологического материала, необходимого как для исследований и разработок, так и для промышленного использования. В Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов особое внимание уделяется разработке эффективных способов долгосрочного хранения практически важных групп бактерий, а также молекулярно-генетической идентификации, паспортизации и таксономической ревизии штаммов микроорганизмов различных таксономических групп.

Выполнена молекулярно-генетическая реидентификация коллекционных штаммов бактерий: *Geobacillus stearothermophilus* БИМ В-139, В-140, В-183, В-202, В-203, В-290, В-291, В-292, В-293, В-294, В-295, В-296, В-297, В-413, В-415, В-433, В-434 на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, поскольку данный метод рекомендован в качестве одного из стандартов и общепринят в авторитетных коллекциях микроорганизмов. Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемые штаммы принадлежат к следующим систематическим группам *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Aeribacillus*. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных Gen Bank. По результатам проведенного анализа сиквенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, тестируемые штаммы наиболее близки к виду *Aeribacillus pallidus* (95-99%).

Для установления более точной принадлежности исследуемых штаммов к виду *Aeribacillus pallidus* были проведены биохимические тесты с глицеролом, желатином, крахмалом, ксилозой, рамнозой, сорбитолом, целлобиозой и цитратом натрия. По результатам тестов для штаммов *Geobacillus stearothermophilus* БИМ В-139, В-140, В-202, В-203, В-290, В-291, В-292, В-293, В-294, В-295, В-296, В-297, В-413, В-433, В-434 подтверждена принадлежность к виду *Aeribacillus pallidus*, а видовой диагноз *Geobacillus stearothermophilus* БИМ В-415 и БИМ В-183 остался неизменным.

В данной работе были также исследованы протеолитическая, амилолитическая и целлюлолитическая активности коллекционных штаммов микроорганизмов. По результатам биохимических исследований штаммы *Aeribacillus pallidus* БИМ В-202 и *Aeribacillus pallidus* БИМ В-295 обладают протеолитической и целлюлолитической активностью, остальные исследуемые штаммы обладают только целлюлолитической активностью. Амилолитической активностью не обладает ни один из анализируемых штаммов. Выражаем благодарность научному руководителю к.б.н. Г. И. Новик.

Сравнительная характеристика бактерий-продуцентов сидерофоров катехолового типа

Сорокина А.В.¹, Щербакова Т.А.², Тойменцева А.А.¹, Шарипова М.Р.¹,
Хияс И.В.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия, Казань

² ФГУП «Центральный научно-исследовательский институт геологии нерудных полезных ископаемых», Россия, Казань

AlVita.94@yandex.ru

Многие бактерии и микроскопические грибы способны продуцировать вторичные метаболиты, принимающие участие в различных физиологических и биохимических процессах. К вторичным метаболитам микроорганизмов, участвующим в получении труднодоступного железа из окружающей среды, его переводе в доступную форму и транспортировке внутрь клеток, относятся сидерофоры. Сидерофоры также способны формировать комплексы с другими металлами (актиноидами и тяжелыми металлами), что является несомненным преимуществом для микроорганизмов, адаптированным к экстремальным условиям.

Целью данной работы явилась оценка способности бактерий, выделенных из минералов, содержащих тяжелые металлы, продуцировать сидерофоры катехолового типа. Идентификацию бактерий проводили по методу MALDI Biotyper. Продукцию сидерофоров культурами бактерий в среде M9 оценивали методом Арноу и Аткина, а также посевом на специализированную среду, содержащую краситель хром азурол S. Анализ продукции сидерофоров катехолового типа показал, что наибольшее количество синтезируют грамотрицательные бактерии *Rhizobium radiobacter* на 36ч культивирования (136 мкМ), принадлежащие к классу *Alphaproteobacteria*. Бактерии *Pseudomonas anguilliseptica*, относящиеся к *Gamma*proteobacteria, продуцируют наибольшее количество сидерофоров к 24ч культивирования, однако их концентрация не превышает 115 мкМ. Кроме этого, *Acinetobacter lwoffii*, также принадлежащий к классу *Gamma*proteobacteria, после 36ч культивирования, аккумулировал в среде не более 30 мкМ сидерофоров катехолового типа. *Delftia acidovorans* (класс *Beta*proteobacteria) продуцировал в среднем 50-60 мкМ сидерофоров. Было показано, что представители *Firmicutes* грамположительные бактерии *Bacillus pumilus* и *Bacillus atrophaeus* значительно различаются по способности синтезировать сидерофоры катехолового типа. Наиболее активными продуцентами оказались *Bacillus pumilus* (100 мкМ) в сравнении с *Bacillus atrophaeus* (не более 30 мкМ).

Таким образом, были идентифицированы наиболее активные продуценты сидерофоров катехолового типа, выделенные из минералов, содержащих высокие концентрации тяжелых металлов. Продукция сидерофоров такими бактериями может играть важную роль в процессах адаптации клеток к стрессовым условиям, а также вносить вклад в процессы минерализации минеральных пород. Выделенные бактерии имеют потенциал для изучения и последующего использования в процессах биоремедиации территорий, загрязненных тяжелыми металлами.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом по программе «УМНИК».

Особенности действия серотонина и дофамина на биосенсор «Эколюм» в условиях электромагнитного загрязнения среды

Сорокина Елена Владимировна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

sorokina_ev77@mail.ru

Проведена оценка биологического действия нейромедиаторов (серотонин-креатинин сульфата и дофамина-НСI) в условиях электромагнитного загрязнения среды, которое было смоделировано с помощью нетеплового электромагнитного излучения (ЭМИ) низкой интенсивности (длина волны в свободном пространстве $\lambda = 7.1$ мм, соответственно, частота $f = 42$ ГГц). В качестве биосенсора служили бактерии *Escherichia coli* K12 TG1 K12 TG1 с встроенным *lux*-опероном морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* 54D10. В диапазоне концентраций от 5 до 30 мг/л индекс токсичности (Т) находится в пределах 10-20, т.е. серотонин-креатинин сульфат и дофамин-НСI нетоксичны. Обнаружено, что токсичными нейромедиаторы для клеток биосенсора становятся при концентрациях выше 30 мг/л. В работе исследуемый диапазон концентраций был до 100 мг/л. Метод позволил оценить развитие токсического эффекта во времени в пролонгированном опыте.

В работы после подбора токсических концентраций нейромедиаторов была проведена оценка совместного действия ЭМИ и серотонина, ЭМИ и дофамина на биосенсор при низких и высоких концентрациях. Было обнаружено, что облучение отдельно нейромедиатора и биосенсора и дальнейшее их смешивание не усиливает токсичность. Но если добавить к клеткам серотонин и эту пробу облучить ЭМИ, то наблюдается возрастание токсичности серотонина. После облучения индекс токсичности Т был равен 94 против 45 в контроле с серотонином (без облучения). При низких концентрациях серотонина до (10 мг/л облучение не влияет клетки (Т составляет ~14). Таким образом влияние ЭМИ зависит от концентрации нейромедиатора в суспензии клеток. Данный эффект ЭМИ не проявляется у дофамина ни в больших (100 мг/л), ни при малых (0,5 мг/л) концентрациях.

Полученные данные могут представлять медицинский интерес, так как исследуемые нейромедиаторы являются регуляторами широкого ряда физиологических и биохимических реакций всех организмов, а ЭМИ широко используется в практике человека (медицинских приборах, мобильных телефонах, бытовой технике, установках мобильной связи у водоемов и жилищных построек).

Разнообразие хитиназ в микробных сообществах донных осадков Балтийского моря

Теплюк А.В., Самаров Н.И., Корженков А.А.

aeternusmare1414@gmail.com

В Балтийском море существует множество разнообразных биотопов, в которых активно функционируют микробные сообщества, осуществляющие процессы продукции и деструкции органического вещества. Ферменты микробных сообществ морских осадков обладают большим биотехнологическим потенциалом, обусловленным их активностью при низких температурах.

Хитиназы – гидролитические ферменты, расщепляющие гликозидные связи в хитине, играют ключевую роль в его деградации, которая является важным элементом

энергетического цикла морских экосистем. Хитиназы обладают большим спектром биотехнологических приложений, от конверсии биомассы в полезные продукты для сельского хозяйства до технологий производства хитоолигосахаридов для фарминдустрии. Хитиназы являются секретлируемыми ферментами, соответственно структурные особенности этих белков должны быть адаптированы к условиям окружающей среды, что подчеркивает потенциальную значимость исследования биоразнообразия данных ферментов. Однако разнообразие хитиназ микробных сообществ морских осадков морей умеренных широт в настоящее время остается малоисследованным. Единственная работа по анализу гена ChiA в глубоководных донных осадках железомарганцевой провинции Тихого океана показала, что большинство хитиназ принадлежит гаммапротеобактериям рода *Serratia*.

Нами был проведен филогенетический анализ разнообразия хитиназ в микробных сообществах донных осадков Юго-восточной части Балтийского моря. Образцы были отобраны в местах высачивания метана и в местах типовых донных отложений. Из осадков выделялась ДНК, после чего последовательности фрагментов гена ChiA амплифицировались при помощи системы универсальных хитиназных праймеров и клонировались в вектор *pBluescript*. Последовательность вставок определялась при помощи секвенирования по Сэнгеру. Было отсеквенировано 50 вставок каждого образца.

Было показано, что хитиназы микробных сообществ донных осадков Балтийского моря характеризуются большим разнообразием, нежели хитиназы глубоководных экосистем: помимо протеобактериальных хитиназ были обнаружены хитиназы, вероятно принадлежащие представителям филумов *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Полученные нами результаты могут свидетельствовать о том, что хитин является важным источником углерода в микробных сообществах морских осадков на небольшой глубине, а также демонстрируют разнообразие хитинолитиков Балтийского моря.

Автор выражает благодарность за научное руководство И.В.Кубланову(ФИЦ ФОБ РАН), М.О.Ульяновой (АО ИО РАН им. П.П.Ширшова), Н.В.Пименову(ФИЦ ФОБ РАН), С.В. Тошакову (БФУ им.И.Канта).

Криоконсервация как метод сохранения морских психроактивных микроорганизмов-деструкторов углеводов

Федоренко Виктория Николаевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

kusenochka@mail.ru

В лаборатории микробной биотехнологии МГУ имени М.В. Ломоносова создана коллекция морских микроорганизмов, способных к деструкции углеводов нефти при низких температурах (+4°C). Для длительного сохранения жизнеспособных клеток и их функциональной активности широко применяют метод заморозки (криоконсервации) с использованием ДМСО и глицерина в качестве криопротекторов. Согласно литературным данным, эти соединения могут оказывать токсическое влияние на деконсервированные клетки, в связи с чем возникает необходимость их удаления из размороженных суспензий. Цель исследований - изучение влияния 5% ДМСО и 10% глицерина на выживаемость клеток морских психроактивных углеводородокисляющих микроорганизмов в деконсервированных суспензиях. Объектами исследования являлись 9 штаммов бактерий (*Cobetia marina* S1, *C. marina* S2, *C. marina* S3, *Nocardia coeliaca* S1, *Psychrobacter cibarius*

S1, *Arthrobacter rhombi* S1, *A. rhombi* S2, *Salinibacterium amurskyense* S1, *Shewanella vesiculosa* S1), а также 2 штамма дрожжей (*Yarrowia lipolytica* S1, *Y. lipolytica* S2).

Показано, что при заморозке без защитных соединений выживаемость штаммов *C. marina* S3, *Y. lipolytica* S2, *N. coeliaca* S1 и *A. rhombi* S2 составляла около 45%, 69%, 93% и 94% соответственно. Для остальных микроорганизмов показатель жизнеспособных клеток значительно снизился по сравнению с исходным и варьировал от 0,25% до 5%. Отмечена высокая защитная эффективность ДМСО для штаммов *C. marina* S1, *C. marina* S2, *P. cibarius* S1, *A. rhombi* S2. Выживаемость клеток при этом составляла 74-90%. Глицерин оказался более эффективен для сохранения штаммов *C. marina* S3, *N. coeliaca* S1, *S. amurskyense* S1, *A. rhombi* S1, *Y. lipolytica* S2, их выживаемость достигала 82-99%. Таким образом, существенного цитотоксического действия криопротекторов на клетки исследуемых микроорганизмов обнаружено не было. Отмывание протекторов от деконсервированных клеток снижало их титр на 12-75%. Исключением являлся дрожжевой штамм *Y. lipolytica* S1, титр отмытых от ДМСО клеток которого оказался выше на 24%, от глицерина – на 16%. Для *S. vesiculosa* S1 наблюдали повышение титра при хранении, что может быть связано с разделением агглютинированных клеток.

Идентификация генов антимикробных пептидов в штаммах *Bacillus subtilis* GM2 и GM5

Хадиева Гузель Фанисовна, Гилязева Аделия Гаделевна

*Институт фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, Казань
g.h95@mail.ru*

Бактерии рода *Bacillus*, входящие в состав ризосферы, способны ингибировать рост фитопатогенов благодаря синтезу различных антимикробных метаболитов, в том числе циклических липопептидов. Скрининг генов, ответственных за синтез различных антимикробных пептидов позволяет выявить штаммы, обладающие высоким антагонистическим потенциалом.

Целью данной работы является идентификация генов ответственных за синтез антимикробных пептидов у штаммов *B. subtilis*, выделенных из ризосферы.

Штаммы бактерий выделяли из ризосферы картофеля и идентифицировали по гомологии генов 16S рРНК. Гены синтетаз антимикробных пептидов идентифицировали с помощью ПЦР-амплификации с использованием праймеров, сконструированных к генам *ituC* (iturin A syntetase C), *bmyB* (bacillomycin L synthetase B), *fenD* (fengycin synthetase), *srfaA* (surfactin syntetase subunit 1), *bacA* (bacilysin biosynthesis protein BacA).

Из ризосферы картофеля были выделены два изолята грамположительных бактерий, обладающих высокой антагонистической активностью в отношении микромицетов р. *Fusarium*. Бактерии были идентифицированы как *Bacillus subtilis* (98-99% гомологии по генам 16S рРНК) и обозначены как штаммы GM2 и GM5. С помощью сконструированных праймеров в геномах бацилл мы амплифицировали гены, ответственные за биосинтез различных антимикробных пептидов - итурина А (*ituC*), бацилломицина (*bmyB*), фенгицина (*fenD*), сурфактина (*srfaA*) и бацилизина (*bacA*). В геноме штамма *B. subtilis* GM2 идентифицированы 4 гена (*ituC*, *bmyB*, *bacA*, *srfaA*), а у штамма GM5 2 гена (*srfaA*, *fenD*). Таким образом, штамм GM2 имеет потенциальную способность к синтезу циклических липопептидов итурина А, бацилломицина L и сурфактина, а также дипептидного антибиотика бацилизина. Штамм GM5 способен к

синтезу фенгицина и сурфактина. Сравнительный анализ антагонистической активности штаммов показал, что штамм GM5 эффективнее ингибировал рост и развитие микромицетов р. *Fusarium* и *Alternaria* в сравнении со штаммом GM2. Высокая фунгистатическая активность штамма GM5 коррелирует с наличием у этих бактерий гена синтеза фенгицина. Таким образом, способность к синтезу фенгицина и сурфактина *B. subtilis* GM5 имеет важное значение для эффективного биоконтроля фитопатогенных микромицетов.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной К(П)ФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83).

Биологическое действие экзометаболитов бифидобактерий на условно-патогенные штаммы

Харченко Н.В., Нетрусов А.И., Чердынцева Т.А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

Kharchenkonatasha@gmail.com

Микроэкологические нарушения в желудочно-кишечном тракте сопровождают большинство заболеваний. Современные подходы к лечебной коррекции дисбиотических изменений в кишечнике включают ряд важных мероприятий, в том числе направленных на восстановление нормальной кишечной микробиоты. Широко используются пробиотики, включающие в свой состав штаммы бактерий рода *Bifidobacterium*. Протекторная эффективность бифидобактерий по литературным данным, послужила основанием для проверки таковой у выделенных нами ранее 6 штаммов из фекалий млекопитающих.

Цель работы: изучение антибактериальной активности у 6 культур бифидобактерий в экспериментах *in vivo* с использованием *Bacillus mycooides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* в качестве условно-патогенных штаммов.

Использовали 6 штаммов бифидобактерий, культивирование проводили на жидкой бифидо-среде. Одновременно высевают глубинным методом на плотные питательные среды условно-патогенные культуры *B. mycooides*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *E. coli*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa* высевают, далее стерильным пробочным сверлом (диаметр 1.0 см) вырезают лунки, и добавляют в них 1 мл суспензии бифидобактерий. Чашки помещают в термостат при температуре 37 °С. Если тест - организм чувствителен к бифидобактериям, то после инкубации вокруг агаровых лунок образуются зоны отсутствия роста. Чем больше диаметр зоны отсутствия роста тест - организма, тем сильнее действие бифидобактерий. Тест - организм, не чувствительный к бифидобактериям, растет по всей поверхности среды и вблизи лунки.

Опыты *in vitro*, в которых определяли зоны задержки роста условно-патогенных штаммов под влиянием бифидобактерий, свидетельствуют о том, что вокруг тест - объектов формируются выраженные зоны ингибирования роста. У *B. animalis* КМ МГУ №472 наилучшие результаты в ингибировании *B. mycooides*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *Ps. fluorescens*, а у *B. animalis* КМ МГУ №471 в отношении *E. coli*. Основываясь на полученные результаты можно предположить возможность участия метаболитов бифидобактерий в формировании колонизационной резистентности слизистой кишечника. Продемонстрированная в наших экспериментах протективная эффективность со всей

очевидностью доказала вероятность дальнейшего рассмотрения данных бифидобактерий в качестве потенциальных пробиотиков.

Роль протеазы HtrA в образовании биопленки клетками *Bacillus Subtilis*

Чернова Л.С., Рыжикова М.Н., Шарафутдинов И.С., Каюмов А.Р.

*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Россия, Казань
lsch-888@live.com*

Белки HtrA принадлежат семейству сериновых протеаз. Они разрушают денатурированные и несфолдировавшиеся белки, производя качественный белковый контроль и защищая клетки от последствий различных стрессов. Многие штаммы патогенных бактерий из-за нехватки функций HtrA теряют свою вирулентность. У млекопитающих потеря активности HtrA связана с такими заболеваниями как артрит, рак, болезнь Паркинсона, синдром Альцгеймера и многие другие.

Целью данной работы являлось установить влияние протеиназы HtrA на выживаемость клеток *Bacillus Subtilis* в условиях температурного стресса, а также ее значение в образовании биопленки.

Оценку жизнеспособности клеток бактерий с гиперпродукцией этого белка и инактивацией его гена в условиях повышенной температуры провели с помощью дифференциального флюоресцентного окрашивания мертвых и живых клеток данных штаммов. Результаты показали, что при температуре 55 °С жизнеспособность клеток гиперпродуцента в 2,5 раза выше по сравнению с контрольным штаммом. Также жизнеспособность клеток исследовали методом DropPlate. Клетки подвергались температурному стрессу в течении одного часа и высевались на питательную среду с соответствующим антибиотиком. В результате, при температуре 55 °С в штамме с гиперпродукцией протеиназы HtrA количество жизнеспособных клеток было на 3 порядка выше чем в штамме с нокаут мутацией гена HtrA.

Ранее методом окрашивания кристаллическим фиолетовым более низкий уровень образования биопленок относительно исходного штамма показали клетки с нокаут мутацией по гену *HtrA* штамма *B. subtilis*. Были обнаружены морфологические различия колоний клеток *B. subtilis* с гиперпродукцией и инактивацией протеиназы HtrA на твердой питательной среде, а также образование клетками роящихся колоний. Предполагается, что процесс роения как-то связан с продукцией внеклеточного матрикса. Проверку провели окрашиванием колоний красителем CongoRed, окрашивающий амиллоидные белки. У колоний клеток гиперпродуцента толщина окрашенной красителем колонии была в 1,5 раза больше, чем у исходного штамма. У штамма с инактивацией гена *HtrA* было полное отсутствие окраски красителем CongoRed, что свидетельствует об отсутствии в структуре внеклеточного матрикса амиллоидов.

Таким образом, установлено, что повышенный синтез протеиназы HtrA способствует повышению жизнеспособности клеток бацилл в условиях повышенной температуры и образованию ими биопленок.

Структурно-функциональные характеристики микробных сообществ и отдельных физиологических групп микроорганизмов – участников цикла азота, в почвах залежи и интенсивно возделываемого поля

Эмер Наталья Рудольфовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

emer2005s@gmail.com

Интенсивное возделывание почв агросистем, сопровождающееся мощным механическим и химическим воздействием, существенно модифицирует почвенное микробное сообщество, изменяя и даже нивелируя его роль в саморегуляции почвенной системы. Поскольку природные микробные консорциумы являются фундаментом функционирования биосферы, необходимы понимание структурно-функциональных характеристик почвенного микробного сообщества и анализ его устойчивости.

Цель работы – изучение структурно-функциональных особенностей микробных сообществ, а также отдельных физиологических групп микроорганизмов, участвующих в процессах трансформации азота в почвах залежи и интенсивно возделываемого поля.

Экспериментальную работу выполняли с использованием образцов серой лесной почвы, которые отбирали с участков залежи и интенсивно обрабатываемого поля. Время эксплуатации почвы агроэкосистемы и возраст залежи составляют более 20 лет.

Сопряженное использование микробиологического, биохимического и молекулярно-биологического анализов в отношении динамических характеристик почвенного микробного сообщества и отдельных физиологических групп микроорганизмов – участников цикла азота в почве – показало, что интенсивное возделывание почвы способствует изменению активности таких биологических процессов, как азотфиксация и денитрификация, а также является причиной снижения численности и относительной роли эукариотической составляющей микробного консорциума почвы – микромицетов. Многолетняя эксплуатация почвы по интенсивной технологии существенно не изменяет структурные характеристики бактериального сообщества агроэкосистемы, но способствует изменению количественных характеристик микробного роста и формированию в обрабатываемой почве микробного комплекса с ограниченным набором трофических функций, направленных на быстрое потребление легкодоступных источников энергии, и при этом устойчивого к высоким концентрациям минеральных форм азота в почве.

Вместе с тем отмечено, что структурно-функциональные преобразования отдельных физиологических групп микроорганизмов в результате применения интенсивной агротехнологии могут способствовать переходу всего микробного сообщества в состояние, характеризующееся аналогичными или даже более высокими значениями показателей устойчивости микробной системы, по сравнению с ненарушенной, не смотря на упрощение и деструктивное изменение его внутренней организации, а также усечение функциональных возможностей. По этой причине, оценка резистентности микробных сообществ обязательно должна сопровождаться характеристикой их структурно-функциональных особенностей при прогнозировании развития почвенных экосистем и выборе методов их ремедиации.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Роль Aim23p/mtIF3 в синтезе и сборке комплексов IV и V дыхательной цепи в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Анфалова Полина Павловна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

panfalova@yandex.ru

Согласно эндосимбиотической теории митохондрии произошли от некой древней α -протеобактерии. В ходе эволюции большинство генов было перенесено в ядерный геном, однако небольшая часть все же осталась в составе ДНК органеллы. В связи с этим митохондрии обладают собственной системой реализации генетической информации, в частности аппаратом трансляции. Несмотря на происхождение митохондрий от бактерий, их трансляционные системы значительно отличаются по многим параметрам, например, по количеству и структуре факторов инициации. В бактериях на стадии инициации функционируют 3 белковых фактора (IF1, IF2 и IF3), а в митохондриях известны ортологи лишь двух из них – mtIF2 и mtIF3.

Сотрудниками нашей лаборатории был обнаружен белок - Aim23p, выполняющий роль mtIF3 в важном модельном организме *Saccharomyces cerevisiae*. Оказалось, что штамм с делецией по гену AIM23 способен расти на среде с несбраживаемыми источниками углерода, но со значительной задержкой. Таким образом, митохондрии в мутантном штамме до какой-то степени сохраняют свою функцию, что удивительно, принимая во внимание незаменимость IF3 в бактериях. В связи с этим мы решили проанализировать эффект отсутствия Aim23p на функционирование комплексов дыхательной цепи.

Эксперименты по определению активности комплексов дыхательной цепи показали, что активность комплексов IV в штамме с делецией по гену AIM23 составляет всего 25% от величины, наблюдаемой в диком типе. Примечательно, что АТФазная активность комплекса V в обоих случаях была одинакова, но при этом лишь 50% данной величины в случае мутанта ингибировалось в присутствии олигомицина. Данный факт позволил нам предположить, что в клетках с делецией по гену AIM23 значительная доля растворимого компонента F1 не ассоциирована с мембранным сектором F0. Действительно, воспользовавшись одной из разновидностей техники нативного электрофореза (BN-PAGE) нам удалось зафиксировать повышенную концентрацию F1 компонента в мутантном штамме.

Таким образом, данная работа демонстрирует значимость Aim23p в синтезе и сборке комплексов дыхательной цепи.

Инверсии в митохондриальной днк соматических клеток человека

Басс М.В.

Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН[†], Москва

mbassmephi@gmail.com

Как известно, с возрастом в митохондриальной ДНК (мтДНК) в соматических клетках человека происходит накопление структурных мутаций, а именно делеций. Такие делеции образуются с участием гомологичной рекомбинации и имеющихся в мтДНК

прямых повторов длиной 13 п.н. Повышенная частота делеций в мтДНК обнаружена в клетках мозга при таких нейродегенеративных заболеваниях, как болезнь Паркинсона или болезнь Шарко. Кроме того, делеции в мтДНК возникают в клетках при воздействии ионизирующим излучением. Нами было выдвинуто предположение о возможности возникновения в мтДНК родственного типа структурных нарушений, а именно инверсий между инвертированными повторами.

С помощью полимеразной цепной реакции с праймерами, которые комплементарны одной цепи мтДНК и между которыми находится инвертированный повтор длиной 12 пар нуклеотидов, было показано, что в фибробластах кожи человека такие мутации действительно существуют.

Секвенирование ПЦР продуктов выявило, что помимо этих инверсий существуют также инверсии, в образовании которых участвовали значительно более короткие фрагменты микрогомологии длиной 1 – 2 п.н. Это говорит о наличии дополнительном к гомологичной рекомбинации механизме образования инверсий.

Таким образом, в нашей работе охарактеризованы ранее не описанные структурные нарушения в мтДНК соматических клеток — инверсии. Инверсии являются перспективными для получения количественного метода учёта повреждений в мтДНК, который мог бы использоваться для оценки возрастных изменений, влияния различных патологических состояний или для биологической дозиметрии.

Разработка и валидация такого метода является целью наших текущих исследований.

Клеточная линия HeLa-T1 как потенциальная система скрининга ксенобиотиков на эпигенетическую активность

Бейзер А.Ю.^{1,2}, Хитрово И.А.¹, Тилова Л.Р.¹, Лесовая Е.А.^{1,3}, Белицкий Г.А.¹, Якубовская М.Г.¹, Курсанов К.И.¹

¹ФГБУ "РОНЦ имени Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва

²МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

³РязГМУ Минздрава России, Рязань

В настоящее время эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов рассматриваются в качестве связующего звена между окружающей средой и геномом. Изменение эпигенетического статуса клетки при воздействии факторов окружающей среды способно нарушить основные клеточные процессы и привести, в конечном счете, к неопластической трансформации и развитию опухоли. В качестве экзогенных агентов, способных оказывать влияние на основные компоненты системы эпигенетической регуляции транскрипции генов, могут выступать как различные компоненты питания и фармакологические препараты, так и экологические факторы. Ранее нашим отделом впервые был предложен метод скрининга эпигенетически активных соединений на модельной системе клеток человека (HeLa), несущих ретровирусный геном с интегрированным в него эпигенетически репрессированным флуоресцентным белком GFP.

Основной целью данной работы являлось исследование возможности использования данной модельной системы для изучения эпигенетических эффектов ксенобиотиков, подвергающихся в организме метаболической активации с помощью

ферментов микросомных монооксигеназ, определяется составом изоформ цитохрома P-450 и уровнем их экспрессии в клетках используемой линии.

Для оценки состояния ферментативной системы метаболизма ксенобиотиков в клетках линии HeLa-T1 были проведены: (1) исследование конститутивного и индуцированного уровней экспрессии мРНК основных изоформ цитохрома P450; (2) оценка генотоксического эффекта ряда проканцерогенных веществ на клетки HeLa-T1; (3) изучение динамики метаболизма проканцерогенного бензо(а)пирена в клетках HeLa-T1.

С использованием спектрально-флуоресцентного метода мы продемонстрировали, что остаточное количество бензо(а)пирена в среде было обратно-пропорционально плотности посадки клеток и времени инкубации. Методом ПЦР в реальном времени была показана конститутивная экспрессия целого ряда изоформ цитохрома P450 в клетках HeLa-T1, а также повышение уровня мРНК данных ферментов под действием соответствующих индукторов микросомных монооксигеназ. Генотоксический эффект циклофосамида, 3-метилхолантрена, бензо(а)пирена и орто-аминоазотолуола, выявленный при помощи метода ДНК-комет, свидетельствовал о функциональной активности микросомных монооксигеназ.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в клетках линии HeLa-T1 активной системы метаболизма проканцерогенов, что позволяет использовать данную клеточную линию при изучении эффектов ксенобиотиков без применения внешних метаболических смесей (например, микросомальной фракции печени крыс S9).

Влияние одонитевых разрывов нематричной цепи ДНК на транскрипцию нуклеосом РНК-полимеразой II

Берсенева У.В.¹, Герасимова Н.С.¹, Пестов Н.А.²

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

² Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, Саранск
ul.berseneva@mail.ru

Каждый день в эукариотической клетке возникают десятки тысяч одонитевых разрывов ДНК. Накопление таких повреждений может приводить к возникновению двунитевых разрывов и, как следствие, нестабильности генома и раковому перерождению. Упакованная в хроматин ДНК менее доступна для белков репарации, поэтому некоторые скрытые в нуклеосомную структуру разрывы могут оставаться необнаруженными. На данный момент предполагается несколько способов обнаружения таких разрывов.

Разрывы матричной цепи транскрибируемой ДНК могут вызывать остановку РНК-полимеразы II (РНКП II), которая *in vivo* служит сигналом к началу репаративного ответа. Разрывы нематричной цепи свободной ДНК не влияют на эффективность транскрипции. Недавние исследования показали, что при организации в хроматин такие разрывы могут вызывать заметное изменение скорости элонгации, причем эффект на транскрипцию зависит от расположения повреждения в нуклеосомном ядре.

В настоящей работе были получены экспериментальные системы *in vitro* транскрипции мононуклеосомных матриц с разрывами в определённых положениях. Данные системы могут быть удобны для поиска механизмов обнаружения одноцепочечных разрывов. На данный момент предполагается, что наиболее важными способами обнаружения одноцепочечных разрывов являются изменения паузирования при транскрипции через нуклеосомы, а также действие гистоновых шаперонов, типа

PARP1. В данной работе на полученных системах были проведены исследования влияния одноцепочечных разрывов на транскрипцию через нуклеосомы. Было показано, что одностранные разрывы ДНК могут влиять на транскрипцию РНКП II: заметно ослаблять паузирование РНКП II, характерное для транскрипции неповрежденной матрицы. Такой результат согласуется с гипотезой участия суперспирализации в прохождении РНКП II через нуклеосому: одностранный разрыв может снимать напряжения в элонгационном комплексе, действуя как топоизомераза I типа, и ускорять транскрипцию через близлежащие участки ДНК.

Ранее было показано, что ускорение транскрипции РНКП II способствует потере нуклеосом. В таком случае ДНК становится более доступной для различных факторов, в том числе белков систем репарации. Так, в работе показана возможность участия нуклеосомной структуры в распознавании скрытых в её структуре повреждений ДНК.

Авторы хотели бы выразить благодарность Кулаевой О.И. и Студитскому В.М. за научное руководство и обсуждение результатов.

Определение пространственной структуры эндоглюканазы 2 мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*

***Вахрушева А. В.^{1,3}, Кравченко О. В.¹, Тищенко С. В.¹, Габдулхаков А. Г.¹,
Кляшторный В. Г.¹, Немашкалов В. А.²***

¹*Институт Белка РАН*

²*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН*

³*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва*

В настоящее время использование ферментных препаратов в качестве кормовой добавки является ключевым условием для эффективного животноводства. Основой комбикормов являются злаковые культуры, клеточная стенка которых содержит в своём составе труднорасщепляемые некрахмальные полисахариды (НПС). НПС уменьшают скорость прохождения корма по пищеварительному тракту, снижают доступность эндогенных пищеварительных ферментов к корму и тем самым его переваримость и эффективность всасывания питательных веществ. Ключевыми ферментами, используемыми в качестве кормовой добавки для расщепления НПС, являются эндо-1,3(4)-β-глюканазы (эндоглюканаза 2). В качестве промышленно важных продуцентов эндо-1,3(4)-β-глюканаз являются грибы рода *Trichoderma* и *Penicillium*. Последние на сегодняшний день особенно важны благодаря своей продуктивности и способности синтезировать активный и сбалансированный по своему составу ферментный комплекс, а также высокой технологической стабильности индивидуальных компонентов этого комплекса.

Эндо-1,3(4)-β-глюканаза была выделена из *Penicillium verruculosum* и закристаллизована методом диффузии паров в висячей капле при использовании набора JBC Screen Nuc-Pro2. Кристаллы данного белка принадлежат к пространственной группе P4₁2₁2 с параметрами ячейки $a=b=83.8 \text{ \AA}$, $c=89.0 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90.0^\circ$. Структура была определена методом молекулярного замещения и уточнена до $R_{\text{crist}}=21.8\%$ и $R_{\text{free}}=25.9\%$ при разрешении 2.1 \AA . Полученная модель удовлетворяет всем стереохимическим и рентгеноструктурным критериям. Координаты модели депонированы в банк белковых структур (PDB код 5I6S).

Эндогликаназа 2 представляет собой однодоменный белок, имеющий укладку в виде α/β -бочонка. Финальная модель белка содержит 305 аминокислотных остатков, 2 молекулы N-ацетилглюкозамина, 1 молекулу маннозы, 133 молекулы воды.

Информация о структурных особенностях данного фермента должна стать основой для планирования дальнейших работ по сайт-направленному мутагенезу с целью придания ферменту нужных свойств (расширение pH- и температурного оптимума действия, модификация субстратной специфичности, степени гликозилирования и др.), а также увеличения его активности по отношению к НПС сельскохозяйственных кормов.

Изучение взаимного пространственного расположения генов *AML1* и *MLL* и их частых партнеров по транслокациям

***Вьюшков Владимир Сергеевич¹, Ломов Николай Андреевич¹,
Алексеевский Даниил Андреевич²***

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

² НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ
oxygenium22@mail.ru

Существуют две гипотезы возникновения хромосомных транслокаций, рассматривающие трехмерную структуру хроматина как важный фактор, определяющий предрасположенность локусов к перестройкам. Согласно первой, транслокации появляются вследствие неправильной репарации двуцепочечных разрывов, возникших в близко локализованных участках генома («первичность контакта»). Вторая предполагает возникновение разрывов в пространственно удаленных последовательностях генома и способность концов фрагментированной ДНК перемещаться в пространстве ядра, что может приводить к их негомологичному соединению («первичность разрыва»). Нами было показано, что после индукции этопозидом (ингибитор ДНК-топоизомеразы II) двуцепочечных разрывов внутри генов *AML1* и *MLL* за пределами территорий хромосом, в которых лежат эти гены, чаще локализуются концы разрывов, а не интактные аллели данных генов.

На культуре лимфоидных клеток Jurkat человека мы провели 4С-анализ для поиска пространственно сближенных локусов с генами *AML1* (*RUNX1*) и *MLL*, транслокации с участием которых часто наблюдаются при лейкозах. Также мы провели 3D-FISH до и после обработки клеток этопозидом с использованием флуоресцентных зондов разных цветов к концам гена *AML1* и против территории 8 хромосомы, где локализован частый партнер по транслокациям гена *AML1* - ген *ETO*, и последующим анализом конфокальных изображений компьютерной программой.

4С-анализ не выявил предпочтительной колокализации генов *AML1* и *MLL* с их партнерами по транслокациям ни до, ни после обработки этопозидом. Результаты 3D-FISH показали, что после обработки клеток этопозидом внутри последовательности гена *AML1* иногда образуется двуцепочечный разрыв. Однако обработка этопозидом не приводит к уменьшению расстояния между разорванными и неразорванными аллелями гена *AML1* и территорией восьмой хромосомы по сравнению с контролем.

При наблюдении за большим числом клеток не удается выявить тенденций к пространственному сближению протоонкогенов *AML1* и *MLL* с их генами-партнерами по транслокациям, что может свидетельствовать в пользу гипотезы о первичности разрыва. Наблюдения за динамикой фрагментов протоонкогена *AML1* после внесения

индуцированных этопозидом двуцепочечных разрывов не позволяют заключить, что миграция фрагментов идет специфично в направлении хромосомной территории, где локализован частый партнер гена *AML1* по транслокации - ген *ETO*.

Авторы выражают благодарность Рубцову Михаилу Александровичу за научное руководство и всестороннюю помощь.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-93105_НЦНИЛ_а и 15-54-16007_НЦНИЛ_а).

Белок PCID2, участвующий в экспорте мРНК, и его комплекс в ядре и в цитоплазме клеток линии *S2 Drosophila melanogaster*.

Глухова Анна Анатольевна, Копытова Дарья Владимировна

Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

anupochtab@gmail.com

Транспортировка мРНК из ядра в цитоплазму клеток является сложным процессом, в котором участвуют множество белков и белковых комплексов. Для *Drosophila melanogaster* одним из таких комплексов является комплекс TREX-2, в состав которого входят белки ENY2, Xmas-2 и PCID2. До настоящего времени функции белка PCID2 как в ядре, так и в цитоплазме клеток *Drosophila melanogaster* остаются неизученными.

Для исследования функций белка нами были получены и афинно почищены антитела к белку PCID2. Используя полученные нами ядерную, мембранную и цитоплазматическую фракции клеток линии *S2 Drosophila melanogaster*, при помощи метода иммунопреципитации мы провели анализ взаимодействия между собой компонентов комплекса TREX-2 в разных клеточных фракциях. Также с помощью нескольких стадий хроматографической очистки и вестерн-блот анализа мы выделили и сконцентрировали цитоплазматическую фракцию, в которой содержится белок PCID2. Из полученной фракции с использованием пришитых к ProteinA сефарозе антител к PCID2 нами был почищен белковый комплекс в цитоплазме. В результате анализа MALDI-TOF MS был определен белок NudC, который входит в состав PCID2-содержащего комплекса в цитоплазме. Была создана генная конструкция, содержащая кодирующую рамку белка NudC, слитую с FLAG эпитопом. Мы трансфицировали клетки линии *S2 Drosophila melanogaster* данной конструкцией. Выявленные взаимодействия между белками PCID2 и NudC в составе цитоплазматического комплекса мы подтвердили методом иммунопреципитации из лизата клеток с оверэкспрессированным белком NudC-FLAG с использованием вестерн-блот анализа.

Таким образом, в ходе работы мы выяснили, что в *S2* клетках *Drosophila melanogaster* белок PCID2 присутствует в трех формах: в ядерной фракции - около 41 кДа; 45,2кДа, в мембранной - около 41 кДа; 45,2кДа, и 51кДа и в цитоплазматической - 45,2кДа. Нами было детектировано взаимодействие легкой формы PCID2 с белками ENY2 и Xmas2. В процессе исследования белка PCID2 мы показали, что данный белок, находясь в цитоплазме, уже не взаимодействует с компонентами экспортного комплекса TREX-2. Мы почистили цитоплазматический комплекс из эмбрионов *Drosophila melanogaster*, содержащий PCID2, и нашли, что в данном комплексе белок PCID2 ассоциирован с белком NudC.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, №14-14-01059.

Регуляция экспрессии генов SAM-зависимых метилтрансфераз *P.vanderplanki*

Десятяров Руслан Мансурович

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Россия, Казань

ruselusalbus@gmail.com

Наиболее известные гены стрессового ответа, кодирующие супероксиддисмутазы, тиоредоксины, белки теплового шока, представлены в геноме криптобиотической хирономиды *Polypedilum vanderplanki* наряду с необычными стрессовыми генами, связанными в первую очередь с ангидробиозом. Среди последних группа из 15 генов белковых метилтрансфераз PIMT (protein L-isoaspartyl O-methyltransferase, EC.2.1.1.77), организованных в специфический кластер за исключением классического гена PvPimt1. Такие метилтрансферазы способны распознавать и метилировать некоторые, спонтанно возникающие, изоформы аспартата в составе белков клетки, предотвращая их «старение».

В данной работе проведен более детальный анализ экспрессии генов таких PIMT вместе со всеми идентифицированными S-аденозилметионин (SAM) - зависимыми метилтрансферазами в целой личинке при высыхании (RNA-seq, HiSeq2000, Illumina), под действием различных стрессовых факторов (H_2O_2 , паракват, α -, γ -облучение – микрочипы), и при высыхании культуры клеток комара Pv11 (CAGE), которая также способна восстанавливаться после обезвоживания.

Гены SAM-зависимых метилтрансфераз *P.vanderplanki* при высыхании или при воздействии стрессовых условий имеют различные временные профили экспрессии. Интересно, что группа генов, повышающих экспрессионный ответ при действии любого стрессового фактора содержит все 14 особых метилтрансфераз PIMT, тогда как классический ген PvPimt1 оказался в группе генов, отвечающих снижением экспрессии на стрессы. Помимо PIMT к первой группе отнесены метилтрансферазы, связанные с биосинтезом убихинона, 4 гистоновые метилтрансферазы, одна ДНК-метилтрансфераза, РНК-метилтрансфераза PvRNA-MT5, одна из метилтрансфераз биосинтеза ювенильного гормона PvJhamt4, метилтрансфераза PvMfar, связанная с метаболизмом фосфолипидов. Кроме того, среди 14 генов PIMT, явно выделяется PvPimt12, который находится в отключенном состоянии в культуре клеток Pv11 и имеет отличающийся профиль экспрессии при облучении личинок. Метод CAGE показал, что ген PvPimt8 инактивируется в ответ на высыхание в культуре Pv11, тогда как в личинках наоборот – активируется при действии стрессов. Вместе с такими особенностями, возможная регуляция генов PvPimt2 и 3 с помощью антисмысловых РНК в культуре Pv11 и использование альтернативного промотора в случае PvPimt9, подчеркивают функциональные отличия этих ферментов. Дальнейший анализ тканеспецифичности метилтрансфераз PIMT позволит приблизиться к пониманию механизмов устойчивости данного комара к полному обезвоживанию.

Это исследование было поддержано грантом РФФИ № 14-44-00022.

**Особенности структуры промоторных областей генов субъединицы В
сукцинатдегидрогеназы кукурузы *Zea mays L.***

Зенищева М.А., Лопырева Г.Б., Ахмед А. Х. А.

*Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,
Россия, Воронеж
bc366@bio.vsu.ru*

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) занимает ключевое положение в регуляции дыхания митохондрий. Полиморфизм генов комплекса СДГ растений обуславливает необходимость скоординированной регуляции экспрессии генов отдельных субъединиц, в том числе и с помощью эпигенетических факторов. Наиболее часто метилирование связано с CpG-островками, обнаруживаемыми в 5'-регуляторных участках генов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение структуры промоторных областей генов субъединицы В сукцинатдегидрогеназы кукурузы.

Для анализа промоторов генов *sdh2-1*, *sdh2-2* и *sdh2-3* СДГ на наличие CpG-островков использовали программу MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>). Очищенные и экстрагированные ампликоны секвенировали в отделе «ВНТК генной активности» Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино).

Ранее нами было показано, что уровень транскрипции генов *sdh2-1*, *sdh2-2* и *sdh2-3* изменяется по мере прорастания семян кукурузы. Одним из возможных механизмов, приводящих к различию в скорости экспрессии генов, является изменение статуса метилирования их промоторов. Поскольку в базе данных GenBank отсутствует информация о нуклеотидных последовательностях генов, кодирующих субъединицу В СДГ кукурузы нами были проведены амплификация промоторной области геномной ДНК кукурузы, экстракция ампликонов и их сиквенс, на основе которого и проводили дальнейший анализ. Исследование структуры генов *sdh2-1*, *sdh2-2* и *sdh2-3* позволило выявить различия в содержании CG-динуклеотидов в их промоторных областях. Гены *sdh2-1* и *sdh2-2* имели в составе своих промоторов по CpG-островку, что может обуславливать их регуляцию за счет изменения степени его метилирования, тогда как в промоторе гена *sdh2-3* CpG-островка не выявлено.

Т.о., гены *sdh2-1* и *sdh2-2* кукурузы имеют в составе промоторов CpG-островки, что может обуславливать их регуляцию за счет изменения степени их метилирования. Вероятно, для них характерна ко-регуляция, обусловленная необходимостью синтеза группы пептидов, обеспечивающих функционирование определенных метаболических процессов в адаптации при изменении типа питания.

Авторы выражают благодарность научному руководителю к. б. н. Селивановой Н.В.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России, проект № 959.

**В составе белков, взаимодействующих с протеасомами, обнаружена
укороченная изоформа alpha-тубулина**

Иванова Елена Юрьевна

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), Россия, Санкт-Петербург*

ivanova1.027@gmail.com

26S протеасомой называется мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную деградацию белков в клетке. 26S протеасома состоит из 20S частицы, обладающей протеолитической активностью, и одного или двух 19S регуляторных комплексов. Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с 26S протеасомами, и условно поделены на две группы: белки убиквитиновой системы и белки, регулирующие активность и функции протеасом за счет прямого связывания. Определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции. Для решения этой задачи на примере клеток миелогенной лейкемии человека использована стратегия аффинной очистки протеасом с последующим масс-спектрометрическим анализом. Протеасомы очищали из стабильной клеточной линии K562, экспрессирующей субъединицу beta7 20S протеасомы, меченную по С-концу НТВН-пептидом. С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии идентифицированы все субъединицы 26S протеасомы, а также регуляторы PA200 и PA28gamma. Показано, что с протеасомами ассоциированы компоненты убиквитин-протеасомной системы (убиквитин, убиквитин-лигаза UBE3A и деубиквитиназа UCHL5), белки теплового шока (HSPA5, 8, 9: HSPA1A; HSPD1 и HSP90AB1) и некоторые белки цитоскелета (актин, alpha-актинин 4 и alpha- и beta-тубулины). Белки alpha- и beta-тубулины участвуют в формировании микротрубочек. Есть несколько генов alpha- и beta-тубулинов, и они высоко консервативны как между собой, так и между видами. Для многих белков семейства alpha-тубулинов (48-49 кДа) показано существование различных изоформ – результат альтернативного сплайсинга. Интересно, что вестерн-блот анализ с использованием антител, специфичных к alpha-тубулину (TUBA4A), выявил присутствие в комплексе с очищенными протеасомами укороченной версии белка с молекулярной массой, соответствующей 40 кДа в системе SDS-электрофореза. Мы предполагаем, что присутствие тубулинов в списке белков, ассоциированных с протеасомами, определяет транспорт протеасом внутри клетки. Кроме того, такая укороченная форма alpha-тубулина может быть результатом не альтернативного сплайсинга, а процессинга alpha-тубулина протеасомами.

Работа выполнена в Институте цитологии РАН под руководством к.б.н. Цимоха А.С. и при финансовой поддержке грантов РФФИ (15-04-08128 и 16-04-01667).

Влияние синтетической последовательности 5'-НТО с высоким содержанием динуклеотидов CpG на эффективность экспрессии гетерологичного гена в растениях

**Кабардаева К.В.^{1,2}, Кимиссе М.Г.¹, Тюрин А.А.^{1,2}, Гра О.А.¹, Фадеев В.С.¹,
Голденкова-Павлова И.В.¹**

¹*Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия*

²*Российский государственный аграрный университет –*

МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

kabardaewa@yandex.ru

Литературные данные свидетельствуют о том, что важную роль в процессах регуляции экспрессии генов играют цис-элементы, которые локализованы выше промоторной области, т.е. в 5'-НТО (нетранслируемая область) мРНК или кодирующих областях генов, и которые выступают в роли эффективных регуляторных элементов транскрипции и/или трансляции. Разнообразие функций и противоположных эффектов, в частности, CpG динуклеотидов в регуляторных и кодирующих областях генов эукариот позволяет сделать предположение о том, что они могут играть ключевую роль в регуляции экспрессии генов.

Основываясь на результатах немногочисленных работ, нами были проведены исследования, направленные на выяснение роли нуклеотидного состава 5'-области гена на эффективность экспрессии репортерного гена термостабильной лихеназы в растениях. Сконструирована синтетическая последовательность, которая содержит характерные для 5'-области генов растений CG-богатые мотивы, выявленные на основании *in silico* анализа 5'-областей генов растений. Получены линии трансгенных растений табака, в которых репортерный ген термостабильной лихеназы находится под контролем конститутивного промотора 35S РНК CaMV и дополнительного регуляторного элемента: синтетической CG-богатой последовательности, которая функционирует как 5'-НТО мРНК репортерного гена, или как 5'-область кодирующей последовательности гибридного гена, в котором синтетическая последовательность слита в рамке считывания с последовательностью репортерного гена. Результаты сравнительного анализа уровня мРНК и уровня белкового продукта в полученных линиях трансгенных растений показали, что синтетическая CG-богатая последовательность достоверно увеличивает уровень транскрипции репортерного гена и, по всей видимости, не оказывает негативного влияния на эффективность трансляции мРНК репортера, что может быть обусловлено особенностями ее нуклеотидного состава и структуры, а именно, наличием специфических для 5'-областей генов растений мотивов и свойствами вторичной структуры – отсутствием шпилечных структур с высокой энергией их образования. Таким образом, впервые получены экспериментальное подтверждение, что 5'-области с высоким содержанием динуклеотидов CpG, могут способствовать увеличению уровня транскрипции генов и у растений.

Метод массированного полноразмерного секвенирования библиотек генов антител с использованием молекулярного баркодирования

Турчанинова М.А.^{1,2}, Британова О.В.^{1,2}, Киргизова В. И.¹, Егоров Е.С.^{1,2}, Староверов Д.Б.^{1,2}, Болотин Д.А.^{1,2}, Шугай М.^{1,2}, Чудаков Д.М.^{1,2}**

¹*Shemiakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow*

²*Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow
vitalina.kirgizova@gmail.com*

Метод высокопроизводительного секвенирования позволяет глубже взглянуть на проблему разнообразия рецепторов иммунной системы, определяющих специфичность Т- и В-клеточного адаптивного ответа. Разнообразие распознающих молекул чрезвычайно велико, в организме одного человека может существовать до 10⁸ вариантов антител.

Несмотря на развитие методов, позволяющих проводить профилирование репертуаров иммуноглобулинов, ни один из ранее существующих не позволяет полностью избавиться от накопленных ошибок во время пробоподготовки и секвенирования, без потерь реального разнообразия.

Разработан протокол для массированного полноразмерного секвенирования библиотек генов антител человека и мыши. Протокол включает в себя использование уникальных молекулярных баркодов на стадии синтеза кДНК, которое позволяет произвести коррекцию ошибок и нормировку результатов. С применением асимметричного секвенирования 400+100 п.н. Illumina и последующей обработкой данных программным обеспечением MIGES достигнуто почти безошибочное полное прочтение гена длиной до 750 п.н.

Полученные данные позволяют не только определить с высоким покрытием переменные части генов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов, играющих главную роль в распознавании молекулы антигена, но и сохраняют важную информацию об изоформе.

Разработанный протокол позволяет за небольшой срок (6 дней) произвести полное профилирование антител человека и мыши, включая стадию пробоподготовки - 1 день.

С использованием протокола подготовлены и получены библиотеки генов иммуноглобулинов из малых количеств сортированных В-клеток молодых и пожилых доноров до и после иммунизации.

Важны ли N- и C-концевые участки Aim23p для его функционирования в качестве третьего фактора инициации трансляции

в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Климонтова Мария Вячеславовна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

m.klimontova@gmail.com

Белок Aim23p является митохондриальным фактором инициации трансляции 3 в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Несмотря на то, что он является ортологом бактериального IF3, Aim23p заметно отличается от своего прокариотического гомолога наличием N- и C-концевых удлинений. Многочисленные эксперименты *in vitro* с человеческим mtIF3 показали, что данные участки белка необходимы для предотвращения ассоциации его с большой субъединицей миторибосомы. К сожалению, на сегодняшний

день нет экспериментальных данных, демонстрирующих насколько важны эти участки белка *in vivo*.

Эксперименты по функциональной комплементации полноразмерного Aim23p различными укороченными версиями показали, что ни N-, ни C-концевой участок по отдельности не важны для нормального функционирования митохондрий. Однако, к нашему удивлению, оказалось, что одновременная делеция данных участков белка приводит к фенотипу клеток с отсутствием гена AIM23. Принимая во внимание тот факт, что бактериальный фактор способен частично восстановить митохондриальную функцию клеток дрожжей с делецией по гену AIM23, мы решили провести обратный эксперимент, и проанализировать функциональную активность Aim23p в бактериальной системе *in vivo*. Несмотря на то, что ген *infC*, кодирующий IF3 в бактерии *E. coli*, является абсолютно жизненно важным, нам удалось получить и проанализировать мутантные штаммы бактерий, в которых различные варианты Aim23p заменяют IF3. Оказалось, что присутствие N- и C-концевых участков в составе Aim23p сильно мешает его работе в качестве фактора инициации в клетках *E. coli*.

Таким образом, было показано, что хотя бы один из N- и C- концевых участков необходим для функционирования белка Aim23p в митохондриях дрожжей *in vivo*. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что данные участки белка появились в ходе эволюции в ответ на изменения митохондриального аппарата трансляции.

Определение детерминант специфичности узнавания мишеней CRISPR-Cas системами третьего типа термофильной бактерии *Thermus thermophilus*
Козаева Е.С.

Институт Биологии Гена РАН, Россия, Москва
ekaterina.kozueva@gmail.com

Системы адаптивного иммунитета прокариот CRISPR/Cas (от англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/ CRISPR — ассоциированные белки) состоят из CRISPR-кассет ДНК, содержащих идентичные повторы, разделенные уникальными спейсерами, и набора *cas* генов. CRISPR/Cas системы защищают клетки от чужеродного генетического материала, уничтожая ДНК фагов или плазмид, в которых имеются последовательности (т.н. протоспейсеры), идентичные последовательностям спейсеров CRISPR кассеты. Этот процесс получил название «CRISPR интерференции», молекулярный механизм которого плохо понятен. В работе сделана попытка проанализировать детерминанты специфичности узнавания протоспейсеров CRISPR-Cas системами третьего типа термофильной бактерии *Thermus thermophilus*.

Для этого бактерии трансформировали плазмидами, содержащими разные мутантные вариации протоспейсера. Производили замену нуклеотидов протоспейсера дикого типа на комплементарные им, с целью сохранения количества водородных связей в цепи ДНК. После трансформации делали серию разведений клеток до единичных колоний. Далее оценивали рост бактерий, эффективность трансформации и влияние внесенной мутации на интерференцию.

Показано, что внедрение индивидуальных мутаций каждого пятого нуклеотида протоспейсера (позиции 5, 11, 17, 23, 29, 35) не оказывают эффекта на РНК

интерференцию. Были внесены мутации «пятерками» на всем протяжении протоспейсера (позиции 1-5, 7-11, 13-17, 19-23, 25-29, 31-35, 37-40), что не влияло на его узнаваемость системой, эндонуклеазы разрезали мишень - интерференция сохранялась. Более того, множественные мутации в областях «раскуса» спейсера, включая такие мутации, как 5, 11, 17, 23, 29, 35, привели к полному снятию интерференции лишь при мутировании пяти/шести позиций одновременно. Были также сделаны мутации в различных положениях начальных и конечных нуклеотидов протоспейсера, которые показали допустимые границы его мутирования, при которых почти не оказывалось влияния на РНК интерференцию. Интересной оказалась мутация 1,2, 27-40, при которой узнавание протоспейсера не наблюдалось.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что CRISPR-ассоциированная РНК-интерференция в термофильных бактериях проявляет удивительную гибкость при мутировании оснований мишени кРНК. Снятие интерференции происходит при изменении нескольких областей протоспейсера, играющих ключевое значение в процессе внесения разрыва в ДНК.

**Разработка молекулярно-генетического метода экспресс идентификации
опасного вредителя зерновых культур – *Eurygaster integriceps***

Кокина Анастасия Васильевна, Сыромятников Михаил Юрьевич

ФГБОУ ВО «ВГУ», Россия, Воронеж

nastenka.kokina@mail.ru

В России насчитывается более 130 видов насекомых-вредителей зерновых культур, среди которых наиболее опасными считаются клопы рода *Eurygaster spp.* Морфологически эти виды сложно отличить, при этом степень вредоносности в зависимости от вида существенно различается. Самым опасным представителем этого рода является вредная черепашка (*Eurygaster integriceps*). Этот вредитель способен уничтожить до 50% посевов зерновых.

В мире широко распространен метод идентификации животных с помощью «баркодинга» ДНК. Суть метода заключается в секвенировании гена субъединицы 1 цитохромоксидазы, локализованного в митохондриальной ДНК, с последующим сопоставлением полученной нуклеотидной последовательности с международными базами данных (Boldsystem и Genbank).

Нами был разработан молекулярно-генетический метод, позволяющий быстро идентифицировать *Eu. integriceps*. На первом этапе работы нами был секвенирован ген субъединицы 1 цитохромоксидазы длиной 658 п.н. из *Eu. integriceps*, *Eu. testudinaria*, *Eu. maura*, *Eu. dilaticollis*. Для амплификации гена использовали праймеры LepF1 и LepR1. «Баркодинг» ДНК наиболее опасного вредителя – *Eurygaster integriceps* – сделан нами впервые в мире. Были идентифицированы сайты полиморфизма нуклеотидов для каждого вида клопа. Нами было протестировано два основных метода экспресс-идентификации вредной черепашки по ДНК: использование Taqman зондов и рестрикционный анализ (ПЦР-ПДРФ). При использовании Taqman зондов так и не удалось добиться 100% воспроизводимости результата. В среднем на 9 удачных попыток приходилось 2 неудачных.

Для проведения рестрикционного анализа нами были использованы рестриктазы: Ahi I (у *Eu. integriceps* образует фрагменты длиной 370 и 288 п.н.), BamH I (у *Eu.*

integriceps образует фрагменты длиной 370 и 288 п.н.), Bst2U I (у *Eu. integriceps* образует фрагменты длиной 384, 274 п.н.), Psi I (у *Eu. integriceps* образует фрагменты длиной 488, 170 п.н.). Длины фрагментов у других клопов того же рода существенно отличались, а ферменты BamH I и Bst2U I не имели у них сайтов рестрикции. Наблюдалась 100% воспроизводимость и точность рестрикционного анализа. Таким образом, наиболее подходящим методом экспресс-идентификации вредной черепашки (*Eu. integriceps*) является ПЦР-ПДРФ гена субъединицы 1 цитохромоксидазы с использованием рестриктаз Ahi I, BamH I, Bst2U I и Psi I.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00176).

Лошади народа хунну: генотипирование и определение масти

Куслий Мария Александровна

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, Новосибирск

kusliy.maria@mcb.nsc.ru

В настоящее время собраны большие коллекции костных останков древних лошадей из погребальных комплексов на территории Сибири, относящихся к разным историческим эпохам. На уровне ДНК эти уникальные образцы практически не исследованы. Анализ митохондриальных геномов и ядерных генов, ассоциированных с фенотипом, дает возможность определить генетический состав популяций лошадей и филогеографические связи между ними.

Для выделения древней ДНК был использован метод сорбции ДНК на силике, для биотинилирования митохондриального генома и генов окраски - метод ник-трансляции. Было проведено обогащение полученных нами библиотек фрагментов древней ДНК биотинилированными зондами и их секвенирование на платформе MiSeq.

В ходе работы была выделена ДНК из костей 6 лошадей из могильника Царам, элитного комплекса хуннских захоронений (I в. до н.э. - I в. н.э.). Были получены 6 обогащённых библиотек. Секвенировав митохондриальные геномы, мы определили гаплогруппы лошадей хунну по классификации Achilli и их место на филогенетическом древе современных лошадей. Согласно полученным результатам, все древние лошади относятся к гаплогруппе E, которая встречается среди современных лошадей породы мареммано из Италии. Мы определили, что две лошади хунну принадлежали серой масти, а остальные имели дикую окраску (гнедую или вороную масти). Была построена филогенетическая сеть по последовательностям первого гипервариабельного района митохондриального генома древних и современных лошадей Монголии, Тывы и Бурятии и древних лошадей народа хунну. Исследуемые лошади, как было выявлено, по классификации Cieslak относятся к гаплотипу X3, который является предковым для гаплогруппы X3 современных лошадей Монголии, Тывы, Бурятии.

Было выяснено, что в I в. до н.э. - I в. н.э. серая масть была распространена среди одомашненных лошадей народа хунну. Это позволяет заключить, что именно по этой масти в хуннских племенах происходил искусственный отбор лошадей. По филогенетической сети было определено, что исследуемые лошади являются предками современных лошадей Бурятии, Монголии, Тывы, принадлежащих к гаплогруппе X3. На основании построенного нами филогенетического древа, был также сделан вывод, что

древние лошади хунну и современные лошади породы мареммано являются родственными ветвями эволюции.

Получение и оценка свойств рекомбинантного анти-HER2 иммунотоксина

Кутова Ольга Михайловна, Соколова Евгения Александровна

ННГУ имени Н.И. Лобачевского, Россия, Нижний Новгород

rapicat@rambler.ru

В настоящее время таргетная терапия является активно развивающимся подходом в лечении злокачественных новообразований. В числе перспективных агентов в этой области можно выделить рекомбинантные иммунотоксины. Это белковые молекулы, имеющие в своем составе два структурных и функциональных модуля: направляющий, который связывается с молекулой-мишенью, и эффекторный (токсический), который убивает клетку.

Целью работы являлось получение и оценка свойств нового рекомбинантного иммунотоксина, специфичного к онкомаркеру HER2, гиперэкспрессия которого характерна для многих опухолей эпидермального происхождения. Направляющий модуль иммунотоксина представлен белком из класса дарпинов. Белки этого класса созданы на основе повторов в молекуле природного анкирина и способны, подобно антителам, к высокоспецифичному связыванию с антигеном, специфичность к которому придается им методами генной инженерии. Эффекторный модуль представлен псевдомонадным экзотоксином А, лишенным собственного связывающего модуля.

В ходе исследования были подобраны оптимальные условия экспрессии целевого иммунотоксина в бактериальном продуценте, при которых он нарабатывается в растворимой фракции и в количестве, приемлемом для использования в дальнейших исследованиях. Для этого проводилась трансформация различных штаммов *E. coli* вектором, кодирующим иммунотоксин. Очистка иммунотоксина проводилась в две стадии методами металлоаффинной и ионообменной хроматографии в нативных условиях. Присутствие белка в очищенном образце было специфично подтверждено вестерн-блот анализом. В эксперименте *in vitro* на трех линиях клеток было показано, что полученный иммунотоксин специфически ингибирует рост HER2-положительных клеток в культуре, а также, что его токсичность для клеток коррелирует со степенью экспрессии онкомаркера HER2. Противоопухолевая эффективность полученного иммунотоксина показана в предварительном эксперименте *in vivo* на бестимусных мышах, носителях HER5-гиперэкспрессирующей опухоли человека.

Авторы выражают глубокую признательность своим научным руководителям: к.б.н., доц. Балалаевой И.В. и д.б.н., проф., чл.-корр. РАН Дееву С.М.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор № 14.Z50.31.0022, соглашение RFMEFI57814X0051).

**Разработка подходов для анализа повреждений ДНК, зависящих от стадии
клеточного цикла**

***Лужин Артем Васильевич, Величко Артем Константинович,
Кантидзе Омар Леванович***

*Институт биологии гена РАН, Россия, Москва
artyom.luzhin@gmail.com*

Одним из самых востребованных и чувствительных методов анализа повреждений ДНК является метод ДНК-комет (гель-электрофорез одиночных клеток), который позволяет оценивать уровень повреждений ДНК в индивидуальных клетках. Метод основан на разной скорости миграции поврежденной и неповрежденной ДНК индивидуальных лизированных клеток в постоянном электрическом поле. Одним из ключевых этапов этого метода является анализ изображений ДНК-комет. Существует несколько коммерческих программ, позволяющих анализировать изображения ДНК-комет, однако в этих программах пользователь вручную должен выделять ДНК-кометы, что ограничивает количество анализируемых объектов и увеличивает время анализа. В последнее время появляется все больше данных о том, что чувствительность клеток к различным генотоксическим агентам может существенно отличаться в зависимости от фазы клеточного цикла. В нашей работе мы разработали модификации метода ДНК-комет и алгоритмы для автоматического анализа изображений препаратов ДНК-комет, направленные на то, чтобы, помимо информации о повреждении ДНК, определять стадию клеточного цикла каждой конкретной ДНК-кометы.

Наш алгоритм мы разрабатывали в программной среде анализа биологических объектов CellProfiler. Мы анализировали изображения ДНК-комет, полученные из несинхронизированных клеток HeLa. Для отнесения ДНК-кометы к определенной фазе клеточного цикла, мы предварительно инкубировали клетки с бромдезоксипуридином (BrdU), который является аналогом тимидина и включается в ДНК S-фазных клеток. Окраска ДНК-комет антителами против BrdU, позволила нам отделить на изображении ДНК-кометы из S-фазных клеток, а оставшиеся ДНК-кометы разделить на G1-фазные и G2/M-фазные. Используя такой подход, мы проанализировали несинхронизированную популяцию клеток HeLa, и сравнили количество повреждений ДНК с уровнем повреждений ДНК клеток, обработанных этопозидом. Этопозид вносит двунитевые разрывы в ДНК, за счет ингибирования ДНК-топоизомеразы II, активность которой увеличивается к G2-фазе клеточного цикла. Анализируя ДНК-кометы из таких клеток с использованием нашего алгоритма, мы обнаружили разное количество повреждений ДНК в разных фазах клеточного цикла. Как и ожидалось, количество повреждений напрямую коррелировало с активностью ДНК-топоизомеразы II. Результатом нашей работы является алгоритм способный в автоматическом режиме идентифицировать и анализировать большое количество ДНК-комет, а также оценивать уровень повреждений ДНК в клетках на разных стадиях клеточного цикла.

Опухолеспецифические пептиды для адресной доставки противоопухолевых лекарственных средств

Макарцова А.А.¹, Немудрая А.А.²

*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
факультет естественных наук*

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

¹ *makartsova.05@gmail.com*

Адресный подход в диагностике и лечении онкологических заболеваний является одним из наиболее перспективных направлений биомедицинских исследований.

Опухолеспецифические агенты, доставляющие цитотоксические лекарственные средства, позволяют обеспечить непосредственное воздействие на опухоль и избежать неблагоприятных токсических воздействий на здоровые клетки организма. При этом доза препарата, необходимая для достижения терапевтического эффекта, значительно снижается.

Перспективными адресующими агентами в настоящее время считают короткие пептиды, отобранные из фаговых пептидных библиотек.

Целью данной работы является отбор опухолеспецифических пептидов из фаговой пептидной библиотеки в системах *in vitro* и *in vivo* для адресной доставки противоопухолевых лекарственных средств.

Для получения бактериофагов, экспонирующих опухолеспецифические пептиды, был проведен скрининг комбинаторной фаговой пептидной библиотеки (Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library Kit) на культурах раковых клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 и на мышах линии SCID с трансплантированной опухолью человека MDA-MB-231. Определены и проанализированы последовательности отобранных пептидов. Анализ специфичности отобранных фаговых клонов, экспонирующих пептиды, проведен методами титрования бактериофагов на культуре *E. coli* и проточной цитофлуориметрии. Сравнительный анализ специфичности отобранных пептидов, экспонированных бактериофагами, показал достоверное связывание пептидов YTYDPWLIFPAN и FIPFDPMSMRWE с раковыми клетками линии MDA-MB-231 и пептида FIPFDPMSMRWE с раковыми клетками линии MCF-7 по сравнению с бактериофагом дикого типа. Изучено накопление фаговых клонов, экспонирующих отобранные *in vitro* и *in vivo* пептиды, в опухолевой ткани MDA-MB-231 в модели ксенографтов. Методом иммуноцитохимического анализа показано, что фаг, экспонирующий пептид YTYDPWLIFPAN, обладающий наибольшей специфичностью к опухолевой ткани, способен проникать в раковые клетки линии MDA-MB-231.

В результате проведенного исследования из фаговой пептидной библиотеки были отобраны фаговые клоны, экспонирующие пептиды, специфически связывающиеся с клетками аденокарциномы молочной железы человека. Показано преимущественное накопление бактериофага, экспонирующего пептид YTYDPWLIFPAN, в опухоли MDA-MB-231, по сравнению с контрольными органами. Таким образом, отобранные опухолеспецифические пептиды могут быть использованы для доставки лекарственных средств к опухолям молочной железы человека.

Выражаю благодарность своему научному руководителю, канд. биол. наук, Кулигиной Е.В.

Домен цинковых пальцев белка Su(Hw) необходим для формирования функционального Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса
Молодина Варвара Викторовна, Ачилова Маргарита Алишеровна
Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН), Россия, Москва
molodina_varvara@mail.ru

Инсуляторы являются регуляторными элементами, организующими структуру хроматина в ядре эукариотической клетки. Инсуляторы обнаружены в геномах различных видов, от дрожжей до млекопитающих, что свидетельствует об их участии в глобальной регуляции экспрессии генов. Однако механизмы формирования и функционирования инсуляторных комплексов остаются слабо изученными. У *Drosophila* наиболее изучен инсулятор Su(Hw), в состав которого, кроме ДНК-связывающего белка Su(Hw), входят белки CP190 и Mod(mdg4)-67.2.

Для изучения механизма действия инсуляторов *in vivo* часто используют трансгенные модельные системы, основой которых является локус *yellow*, отвечающий за окраску кутикулярных структур дрозофилы. Эхансеры, расположенные в 5' области гена, активируют транскрипцию *yellow* в теле и крыльях. Ранее было показано, что 1 инсулятор Su(Hw), расположенный между эхансерами и промотором гена *yellow*, полностью блокирует их взаимодействие. Если же между эхансерами и промотором встроены 2 Su(Hw)-инсулятора, наблюдается эффект их взаимной нейтрализации, т.е. эхансеры преодолевают инсуляцию и активируют транскрипцию гена.

Взаимная нейтрализация инсуляторов является результатом взаимодействия между Su(Hw)-зависимыми белковыми комплексами, формирующимися на инсуляторных последовательностях. В данной работе мы попытались выяснить, какую роль в таком взаимодействии играют белки Mod(mdg4)-67.2 и Su(Hw), и выявить конкретные домены белка Su(Hw), необходимые для инсуляции, либо для взаимной нейтрализации инсуляторов. С помощью генетических методов и экспериментов в дрожжевой двугибридной системе доказано, что простого взаимодействия между ВТВ-доменами белка Mod(mdg4)-67.2 не достаточно для нейтрализации инсуляции. Кроме того, ни N-концевой домен Su(Hw) в комплексе с белком CP190, ни C-концевой домен Su(Hw) в комплексе с Mod(mdg4)-67.2 не способны формировать функциональный инсулятор, либо обеспечивать взаимодействие между Su(Hw)-зависимыми комплексами. Интересно, что в созданной нами модельной системе даже полноразмерный белок Su(Hw), связывающийся с ДНК и полноценно взаимодействующий с белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2, но не имеющий домена цинковых пальцев, оказался не функциональным.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что домен цинковых пальцев белка Su(Hw) играет весьма важную роль в формировании функционального Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса. Вероятно, цинковые пальцы не только обеспечивают связывание белка со специфичной последовательностью ДНК, но и принимают участие в межбелковых взаимодействиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда - проект № 14-14-01067.

Исследование ферментативной активности рекомбинантной папаин-подобной протеиназы пшеницы тритикаина

Петушкова Анастасия Игоревна

Лаборатория молекулярной биологии и биохимии НИИ молекулярной медицины

1-го МГМУ имени И.М.Сеченова, Россия, Москва

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,

кафедра молекулярной биологии, Россия, Москва

asyapeti@gmail.com

Тритикаин- \square – протеолитический фермент из пшеницы (*Triticum aestivum* L), принадлежащий к семейству папаин-подобных цистеиновых протеиназ. Тритикаин- \square принимает участие в процессинге основных запасяющих белков эндосперма (известных как глютен) и является перспективным кандидатом на роль замещающего фермента в энзиматической терапии глютеновой непереносимости, в том числе, целиакии. Ранее было показано, что тритикаин- \square проявляет глютеназную и коллагеназную активности, однако специфичность действия фермента и параметры его каталитической активности оставались неизвестными.

Методами молекулярного клонирования получены генно-инженерные конструкции для экспрессии следующих рекомбинантных форм тритикаина- \square : тритикаина- \square GM (D23-G348, содержит последовательности продомена и протеиназного домена) и протеиназного домена фермента (L130-G348) в бактериальной системе (*Escherichia coli*), а также тритикаина- \square GM в дрожжевой системе (*Pichia pastoris*). С помощью афинной хроматографии клеточных лизатов получены очищенные препараты указанных форм белка. Методом флуориметрии с использованием пептидных субстратов, конъюгированных с флуорофором 7-аминометилкумарином (AMC), охарактеризована каталитическая активность полученных форм тритикаина- \square .

Установлено, что экспрессия тритикаина- \square GM в бактериальных клетках сопровождается образованием нерастворимых телец включения, в связи с чем возникает необходимость проведения дополнительной стадии рефолдинга белкового продукта. В то же время, при экспрессии в дрожжевой системе фермент секретируется в культуральную среду и является каталитически активным. Методом аналитической ВЭЖХ и флуориметрии показано, что в отличие от тритикаина- \square GM рекомбинантная форма фермента, соответствующая его протеиназному домену, не принимает структуру, необходимую для проявления каталитической активности. Анализ зависимостей начальных скоростей реакции протеолиза различных пептидов от их концентрации показал, что предпочтительными субстратами тритикаина- \square GM являются Ac-VLPQ-AMC и Ac-QLLR-AMC, а также Vz-FVR-AMC, который часто применяют при исследовании, в том числе, катепсин-подобных ферментов.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы: (i) для получения активного фермента предпочтительней использовать дрожжевой штамм-продуцент; (ii) для образования каталитически активной формы фермента необходимо присутствие в его структуре продомена D23-E129; (iii) субстратная специфичность тритикаина- \square определяется наличием гидрофобного аминокислотного остатка в положении P2, что является отличительной чертой большинства папаин-подобных протеиназ растений.

Выражаю благодарность своим научным руководителям Замятнину А.А. и Рубцову М.А.

Работа выполнена в рамках ГК № 14.N08.11.1037 ФЦП «Фарма 2020».

Изменение экспрессии генов трематоды *O. felineus* в ответ на антигельминтный препарат празиквантел

Пирожкова Дарья Сергеевна, Помазной Михаил Юрьевич

ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Россия, Новосибирск
pirozhkova82@mail.ru

Возбудитель описторхоза *Opisthorchis felineus* - плоский червь класса Trematoda, паразит печени млекопитающих (в т.ч. человека), распространён на территории стран СНГ, особенно в бассейнах рек Обь и Иртыш. Основным препаратом, используемым для лечения описторхоза и других трематодозов, является празиквантел. Он изменяет проницаемость мембран клеток паразита для кальция, в результате чего возникает мышечное сокращение, переходящее в паралич.

Целью данной работы было оценить изменение экспрессии генов *O. felineus* в ответ на обработку празиквантелом. Поиск генов, дифференциально экспрессирующихся при воздействии этого препарата, поможет установить, какие именно белки и метаболические пути в наибольшей степени задействованы в защите гельминта от его действия.

Обработку паразитов празиквантелом проводили *in vivo* в сирийских хомячках (*Mesocricetus auratus*) через 145 дней после инфицирования дважды или трижды с интервалом 6 часов по 25 мг/кг веса в каждый прием. Черви, извлеченные из хозяина через сутки после первого введения празиквантела, были использованы для создания и секвенирования библиотеки с помощью технологии Illumina Solexa. Для поиска дифференциально экспрессирующихся генов данные, полученные при массовом параллельном секвенировании, были проанализированы программами RSEM и edgeR.

При анализе дифференциальной экспрессии мы выбрали пороговые значения $\log_{2}FC=1,5$ (кратная разница около 2,8 раза) и FPKM=250 (для контрольного образца). Мы обнаружили, что двукратная обработка празиквантелом *in vivo* не приводит к существенному изменению транскрипции, и вызывает индукцию 8 и уменьшение экспрессии 16 генов. Трехкратная обработка празиквантелом действует на транскрипцию существенно сильнее: вызывает увеличение экспрессии 178 генов и уменьшение – 743. Специфической особенностью изменения транскрипционного профиля паразита в ответ на празиквантел является менее выраженная чем у шистосом активация генов противодействия окислительному стрессу: всего 1 ген индуцируется у описторха против 5 генов у *S. japonicum*. Кроме того, 14 генов *S. japonicum*, связанных с нервной передачей, а именно со слиянием мембранных везикул с синаптической мембраной, увеличивают экспрессию, по крайней мере, вдвое, и только 2 гена этой группы индуцируются у *O. felineus* [1].

Таким образом, было показано, что третья обработка празиквантелом является критической в плане влияния на паразита, а именно на его транскрипционный профиль. Были выявлены группы генов *O. felineus*, экспрессия которых изменяется наиболее значительно после лечения хозяина празиквантелом.

**Исследование индукции бактериальной персистенции пептидным
антибиотиком микроцином С**

Пискунова Юлия Валериевна

Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

julia.piskunova@skolkovotech.ru

Одним из механизмов устойчивости изогенных бактериальных популяций к неблагоприятным факторам окружающей среды (в особенности к антибиотикам) является феномен персистенции. Выживаемость популяции при этом обеспечивается небольшой долей находящихся в покоящемся состоянии клеток, способных успешно противостоять неблагоприятным факторам и давать начало новой популяции метаболически активных клеток, в которой, стоит отметить, будет присутствовать такая же доля покоящихся клеток, что и до изменения окружающей среды. Сравнительно недавно было описано, что присутствие метаболически неактивных клеток является результатом стохастических колебаний в уровне экспрессии генов, продукты которых приводят к ингибированию жизненно важных процессов.

По аналогии с уже известным индуктором персистенции токсином HrpA, мишенью которого является глутамил-тРНК синтетаза, нами было предположено, что одним из таких веществ может являться антибиотик микроцин С *E. coli*, оказывающий бактериостатическое действие путем ингибирования активности аспартил-тРНК синтетазы.

В качестве тестов на развитие персистентного состояния у клеток *E. coli* в ответ на добавление экзогенного микроцина использовали определение количества выживших клеток на чашках питательной среды в ответ на воздействие цiproфлоксацина. Кроме того, в работе использовались методы тонкослойной хроматографии и флуоресцентной микроскопии.

В результате исследований нами был показан путь индукции развития персистенции в клетках *E. coli* в ответ на воздействие экзогенного микроцина С. Были обнаружены и проверены такие ключевые элементы развития персистентности у *E. coli*, как: RelA, SpoT, DksA, (p)ppGpp, протеаза Lon, неорганический полифосфат и токсин-антитоксиновые системы. С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что в популяциях клеток-продуцентов микроцина С *E. coli* наблюдается повышенный уровень клеток в персистентном состоянии по сравнению с клетками, неспособными производить микроцин С. Более того, было обнаружено, что клетки, непродуцирующие микроцин С, но растущие в популяции с клетками-продуцентами микроцина С, показывают повышенный уровень персистентности.

Полученные данные позволяют отнести микроцин С к индукторам персистенции. В работе показан метаболический путь индукции персистенции, вызванной микроцином С. Результаты работы позволяют совершенно по-новому взглянуть на роль антибиотической молекулы микроцина С, как в рамках физиологии клетки, так и в рамках жизни клеточной популяции *E. coli*, то есть «*quorum sensing*».

Роль мембранно-связанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы в формировании изоферментного состава в щитках при прорастании семян кукурузы

**Покусина Татьяна Александровна, Карабутова Людмила Александровна,
Лаптева Анастасия Александровна, Епринцев Александр Трофимович**

ФГБОУ ВО «ВГУ», Россия, Воронеж

bs366@bio.vsu.ru

Ряд исследователей показали, что ферменты окислительного метаболизма имеют сложный характер функционирования в растениях. В частности, было показано, что на начальных этапах развития семян обнаруживается 4 формы сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Функциональная роль изоферментов исследуемого комплекса заключается в обеспечении клетки энергией и биосубстратами. Важную роль в формировании изоферментов СДГ-системы играют мембранно-связанные субъединицы С и D. В связи с этим, представляется актуальным исследование роли экспрессии генов *sdh3* и *sdh4* в формировании изоферментов СДГ.

Объектом исследования служили растения кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропонным способом в течение 10 дней при 22°C.

Исследование показало, что в процессе развития в щитках кукурузы при прорастании семян изменяется изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы. На 4 день прорастания обнаружено 4 формы фермента, а при переходе к фотосинтетической активности (8 день прорастания) обнаруживается только 2 формы.

Определение уровня транскриптов генов *sdh3* и *sdh4* в течение 10 дней прорастания свидетельствует об их дифференциальной экспрессии при прорастании семян кукурузы. Анализ уровня экспрессии генов субъединиц С и D СДГ в щитках кукурузы показал, что экспрессия гена *sdh4* коррелирует с периодом максимальной мобилизации запасных веществ семени. Вероятно, высокий уровень транскрипции данного гена необходим для формирования изоферментов, обеспечивающих протекание энергетического и конструктивного метаболизма. Высокая скорость экспрессии гена *sdh3* необходима для формирования мембранно-связанной формы СДГ и нормальной работы ЭТЦ митохондрий.

Таким образом, высокий уровень транскрипции гена *sdh4* характерен для начального этапа прорастания семян, что связано с важной ролью сукцинатдегидрогеназной системы в обеспечении энергетического и конструктивного метаболизма. Увеличение скорости транскрипции гена *sdh3* к 8 дню прорастания семян кукурузы связано, вероятно, с возрастающей ролью альтернативных путей окислительного метаболизма митохондрий на фоне интенсивного фотосинтеза как источника энергии для нужд клетки.

Участие комплекса ORC в образовании мРНК частицы и экспорте мРНК из ядра в цитоплазму

Попова В.В., Копытова Д.В., Георгиева С.Г.

Институт Биологии Гена РАН, Россия, Москва

popova.varya@gmail.com

Транскрипция, формирование мРНК и транспорт мРНК из ядра в цитоплазму - важнейшие этапы реализации генетической информации. Основным комплексом экспорта мРНК у *Drosophila* является комплекс AMEX (THSC/TREX-2).

В результате очистки комплекса AMEX из ядерного эмбрионального экстракта нами было установлено взаимодействие комплекса AMEX с ORC-комплексом (Origin Recognition Complex). Комплекс ORC входит в состав пререпликативного комплекса и участвует в инициации репликации.

Взаимодействие комплексов AMEX и ORC было подтверждено методами коиммунопреципитации субъединиц комплексов из ядерного эмбрионального экстракта и коиммунопреципитации рекомбинантных белков, экспрессированных с эпитопами HA и FLAG в клеточной системе дрозофилы. Полученные результаты показали, что взаимодействие комплексов осуществляется несколькими субъединицами обоих комплексов, однако субъединица Orc3 из ORC-комплекса наиболее сильно вовлечена во взаимодействие с AMEX. Нами показана частичная колокализация субъединиц комплексов AMEX и ORC на поровых комплексах и внутри ядер клеток, кроме того, мы колокализовали субъединицы комплекса ORC с белком Nxf1 – рецептором ядерной поры. Используя метод РНК-иммунопреципитации ядерного экстракта клеток дрозофилы, мы выявили высокий уровень связывания субъединиц комплекса ORC (Orc3, Orc4, Orc5) с мРНК. Результаты РНК-иммунопреципитации при нокдауне различных субъединиц комплексов AMEX и ORC показали, что AMEX вовлечен во взаимодействие ORC-комплекса с мРНК, однако вероятно не является основным фактором привлечения. На основании подтвержденного нами взаимодействия комплексов ORC и AMEX, нами было предположено, что ORC также может быть ассоциирован с другими факторами экспорта мРНК. Так, нами показано взаимодействие белков Orc3 и Nxf1 методами коиммунопреципитации в ядерном эмбриональном экстракте и коэкспрессии с эпитопами FLAG и HA в клеточной системе дрозофилы. Эксперименты по РНК-иммунопреципитации при нокдауне белка Orc5 (являющегося комплекс-образующим) приводит к значительному снижению уровня ассоциации белка Nxf1 с мРНК гена *ras2*. Кроме того, нами выявлено, что нокдаун субъединиц ORC-комплекса приводит к резкому падению уровня экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Таким образом, нами было доказано взаимодействие комплекса ORC с комплексом TREX-2. Также, мы показали участие ORC в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму у дрозофилы, и непосредственное участие комплекса в привлечении рецептора ядерной поры - Nxf1 к мРНК.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, №14-14-01059.

**Полный митохондриальный геном двух древних лошадей с плато Укок;
применение новых методов получения библиотек для секвенирования**

Попова Ксения Олеговна

Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, Новосибирск

popksenya@gmail.com

Высокопроизводительное секвенирование древней ДНК значительно осложняется постмортальными модификациями нуклеотидов, приводящими к неправильному включению и блокированию ПЦР и наличием значительной доли однонитчатой ДНК, которая теряется при стандартной подготовке библиотек для секвенирования. Основными постмортальными повреждениями ДНК является фрагментация, переход части фрагментов в однонитчатую форму, дезаминирование оснований и их окисление.

Мы использовали набор ферментов для эксцизионной репарации, разработанный сотрудниками ИХБФМ СО РАН, для понижения частоты ошибок и фирменный набор для полногеномной амплификации (WGA) для вовлечения однонитчатой древней ДНК в состав библиотек для секвенирования при исследовании митохондриальных геномов двух лошадей, возрастом около 2,4 тыс. лет из скифских захоронений на плато Укок (Россия, республика Алтай).

Нами была выделена древняя ДНК, получены индексированные библиотеки, проведено обогащение ДНК библиотек искомыми последовательностями с помощью гибридизации с биотинилированными фрагментами современной митохондриальной ДНК.

Мы получили полные митохондриальные геномы и определили их филогенетическое положение среди современных и древних лошадей. Из двух скифских лошадей с плато Укок, исследованных нами, одна представляет собой новый, неизвестный до сих пор гаплотип, а вторая принадлежит к достаточно редкому для Азии гаплотипу I. Обнаружение этого же гаплотипа в скифском кургане в Казахстане позволяет связать его распространение с миграциями скифов.

Предложенные нами методические усовершенствования позволяют значительно увеличить выход древней ДНК. Обработка древней ДНК комплексом ферментов, осуществляющих эксцизионную репарацию приводит не только к 4-5 кратному понижению частоты ошибок но и увеличивает вдвое выход древней ДНК в составе библиотек для секвенирования, видимо за счет удаления блокирующих ПЦР модификаций. Представляется очень перспективным применение метода полногеномной амплификации для вовлечения в состав библиотек для секвенирования однонитчатой ДНК, которая обычно составляет основную долю в древней ДНК. Полученные нами результаты показывают возможность увеличить выход целевого продукта примерно в 4 раза при использовании WGA перед приготовлением библиотек, однако, повышение частоты ошибок требует дальнейшей работы над этим методом.

Локализация повторов *Acipenser ruthenus* с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации

Прокопов Дмитрий Юрьевич

*Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,
Россия, Новосибирск*

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск
dprokopov@mcb.nsc.ru*

Отряд осетрообразных (*Acipenseriformes*) – реликтовая группа рыб, которая представляет значительный интерес с точки зрения эволюции геномов. Изучение геномов осетровых затруднено высокой фрагментированностью кариотипа, хромосомы не идентифицируются с помощью окраски, молекулярные хромосомоспецифичные маркёры отсутствуют, причём до сих пор остаётся неизвестным способ определения пола у всех видов отряда осетровых.

Стерлядь (*A. ruthenus*) является ценным промысловым видом рыбы. Изучение биологии стерляди важно для аквакультуры и определения стратегии охраны данных видов.

В нашей лаборатории было произведено секвенирование геномов самца и самки стерляди, был идентифицирован ряд повторов, количество которых различно у мужских и женских особей. Предполагалось, что локализация таких повторов с помощью FISH поможет идентифицировать половые хромосомы стерляди.

Целью данной работы является выявление и идентификация хромосом, имеющих полоспецифичную картину распределения повторов, а также оценка возможности использования повторов для идентификации хромосом. При помощи метода FISH было локализовано 14 повторов. 8 из них локализируются на множестве мелких хромосом, наблюдается полиморфизм внутри популяции по характеру их распределения. 3 из 14 повторов локализируются в перичентромерной области хромосомы Agut14. При колокализации с зондами 18S и 28S рДНК было выяснено, что 3 повтора локализируются на хромосомах, несущих ядрышковый организатор.

Было обнаружено 6 хромосомоспецифичных повторов, которые в дальнейшем могут быть использованы для идентификации хромосом.

Особенный интерес представляет картина локализации повтора Agut434, которая косвенно указывает на явление частичной тетраплоидности стерляди.

Влияние мутаций N202Q и S286A белка Bgl2p на его секрецию и закрепление в клеточной стенке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Сабирзянов Фанис Альбертович

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

biophoenix@mail.ru

Глюкантрансфераза Bgl2p является одним из основных ферментов участвующих в ремоделинге глюканового компонента клеточной стенки (КС) дрожжей и очень прочно нековалентно закрепляется в КС дрожжей [1]. Белок Bgl2p дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, как и его ортологи в других дрожжах, меняют свою электрофоретическую подвижность при обработке эндогликозидазой Н или PNGазой F и по видимому N-гликозилирован по одному из двух потенциальных сайтов N-гликозилирования (N202 и N284). Две разные группы исследователей с применением разных методов получили противоречивые данные [2,3]. Мы получили штаммы несущие ген BGL2 дикого типа и с мутациями по двум потенциальным сайтам N-гликозилирования. Мутация N202Q, привела к изменению молекулярной массы, которая соответствует негликозилированному белку. При мутации S286A, изменения молекулярной массы белка не произошло. Видимо специфичное N-гликозилирование белка Bgl2p только по остатку N202, который по результатам биоинформатического анализа оказался консервативным среди ортологов Bgl2p в классе *Saccharomycotina* и некоторых других представителей отдела *Ascomycota*, имеет важную роль. Эти мутации на количество внутриклеточного Bgl2p по сравнению с диким типом повлияли не сильно. Оба мутантных варианта оказались способны прочно закрепляться в КС подобно белку Bgl2p дикого типа. Однако, при мутации N202Q до КС доходило заметно большее количество белка, основная часть которого не могла прочно закрепиться в КС и отмывалась при инкубации в 1% растворе SDS. Вероятно, белок Bgl2p должен проходить контроль на правильность сворачивания и при отсутствии N-гликозида этот контроль нарушается и секретируются все популяции молекул Bgl2p, включая неправильно свернувшиеся. Также было замечено, кроме основной полосы белка во внутриклеточной фракции присутствует минорная, на 2-3 кДа большей молекулярной

массой в перпаратах дикого типа и с мутацией N202Q. Предположение о N-гликозилировании по второму сайту минорного вариант белка после обработки эндогликозидазой Н не подтвердилось, и видимо эта полоса соответствует O-гликозилированной по аминокислотам близко ко второму потенциальному сайту N-гликозилирования. Суммируя все выше изложенное, можно сделать вывод, что N-гликозилирование влияет на контроль качества белка Bgl2p, его закрепление в КС.

Экспрессия генов транскрипционных мастер-регуляторов в клетках линии Panc1, стимулированных TGFβ1

Свешикова А. А., Кондратьева Л. Г.

Институт биоорганической химии имени

академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Трансформация эпителиальных клеток в подвижные мезенхимальные клетки, процесс, известный как эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), сопутствует фиброзу и развитию рака, в частности аденокарциномы поджелудочной железы. Переход от эпителиального к мезенхимальному фенотипу может быть вызван воздействием различных факторов, среди которых TGFβ — важный регулятор эмбрионального развития и патогенеза поджелудочной железы.

Данная работа была направлена на изучение экспрессии генов транскрипционных мастер-регуляторов развития поджелудочной железы (ПЖ) при индукции EMT с помощью TGFβ1. Клетки линии Panc1 (протоковая карцинома ПЖ) инкубировали в среде, содержащей TGFβ1, в течение 5 суток, собирали клеточные осадки для анализа, выделяли тотальную РНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения количественного ОТ-ПЦР.

Было проанализировано изменение уровня экспрессии мастер-генов развития поджелудочной железы *SOX9* (ген 9 области детерминации пола *SRY*), *GATA4*, *GATA6* (*GATA*-связывающие факторы) и *FOXA2* (ДНК-связывающий белок forkhead box). Также анализировали изменение уровня экспрессии генов эпителиальной дифференцировки: *MUC1*, белка клеточной адгезии E-кадгерина *CDH1*, белка цитоскелета цитокератина 8 *KRT8* и генов транскрипционных факторов *SNAI1* и *SNAI2*. Изменение морфологии клеток и уровня экспрессии маркерных генов, а также изменение содержания характерных белков подтвердило эпителиально-мезенхимальный переход в клетках Panc1, обработанных TGFβ1. В результате количественной оценки было установлено снижение уровня экспрессии гена *CDH1* в 20 раз, *KRT8* – в 15 раз и увеличение уровня экспрессии *SNAI1* и *SNAI2* в 6 и 20 раз, соответственно. Показано понижение экспрессии в 2, 4 и 5 раз для генов *SOX9*, *GATA4* и *FOXA2*, соответственно. Для *GATA6* изменение экспрессии не наблюдалось.

Таким образом, полученные данные показывают снижение уровня экспрессии выбранных генов мастер регуляторов развития ПЖ в клетках линии Panc1 при эпителиально-мезенхимальном переходе.

Научный руководитель - к. х. н., И. П. Чернов.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-50-00131.

Тетраспанин CD63, слитый с флуоресцентным белком tagRFP, покидает клетки линии HeLa в составе экзосом

Селенина Анастасия Вадимовна

*Санкт-Петербургский государственный университет, Институт цитологии РАН,
Россия, Санкт-Петербург
nessa-5@yandex.ru*

Экзосомами называют внеклеточные микровезикулы диаметром 30-100 нм, выделяемые в межклеточное пространство различными клетками млекопитающих. Эти везикулы обнаружены в большом количестве в сыворотке крови и других внеклеточных жидкостях организмов и содержат большой набор разнообразных белков, мРНК и микроРНК. По-видимому, экзосомальная секреция и поглощение представляет собой особый способ коммуникации, посредством которого передаются различные сигналы от клетки к клетке. Механизмы, с помощью которых экзосомы выходят или поступают в клетки, недостаточно изучены. Не известны также роль и функции белков, находящихся в этих везикулах, и почему внутриклеточные белки покидают клетки именно таким путем. Трансмембранный белок CD63 относится к белкам семейства тетраспанинов и является одним из маркеров экзосом. Чтобы наблюдать за прижизненным транспортом экзосом в течение длительного времени, в настоящей работе была создана стабильная клеточная линия на основе клеток аденокарциномы шейки матки человека HeLa, экспрессирующая белок CD63, меченный на С-конце модифицированным красным флуоресцентным белком tagRFP. Временные трансфекции клеточных линий часто приводят к сверхэкспрессии исследуемого гена, превышающей его физиологический уровень в клетке, что может привести к полному «замолканию» трансгена. Нами был использован метод ретровирусной доставки трансгенной конструкции CD63-tagRFP. Анализ получившейся клеточной линии проводили при помощи различных подходов. Во-первых, мы использовали флуоресцентную микроскопию для визуализации tagRFP в цитоплазме клеток. Во-вторых, иммунный анализ для определения уровня экспрессии трансгенной конструкции в клетке. В-третьих, показали, что трансгенный белок покидает клетки в составе экзосом и может интернализироваться клетками дикого типа.

Таким образом, данная клеточная модель позволит в будущем изучить механизмы секреции и интернализации экзосом, открывая новые пути передачи белков и других молекул.

Работа выполнена под руководством к.б.н. Цимоха А.С. и при финансовой поддержке РФФИ (16-04-01667) и РНФ (14-50-0068).

Изменение баланса экспрессии изоформ VEGFA в гепатоцеллюлярной карциноме человека

**Сковородникова Полина Андреевна¹, Чесноков Михаил Сергеевич², Лазаревич
Наталья Леонидовна^{1,2}**

¹ НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, ² ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ,
Россия, Москва
uapolyas@mail.ru

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) - наиболее распространенная форма злокачественных опухолей печени, характеризующаяся неблагоприятным прогнозом и

низкой чувствительностью к терапии. Один из ключевых этапов прогрессии ГК – усиление ангиогенеза, основным индуктором которого является фактор роста эндотелия сосудов VEGFA. Описано несколько изоформ VEGFA, образующихся за счет альтернативного сплайсинга и различающихся функциональной активностью. Целью исследования стало изучение профиля экспрессии изоформ VEGFA в неопухолевых образцах печени и ГК человека и количественная оценка изменения уровня экспрессии изоформ.

В работе было исследовано 20 пар образцов ГК и неопухолевой ткани печени тех же пациентов. Спектр экспрессирующихся изоформ VEGFA исследовали методом полуколичественного ОТ-ПЦР-анализа с праймерами, амплифицирующими ПЦР-продукты разной длины, соответствующие разным изоформам. Уровни экспрессии отдельных изоформ анализировали методом количественной ОТ-ПЦР со специфическими для каждой изоформы праймерами.

Мы установили, что в печени преобладает экспрессия изоформ VEGFA-189, VEGFA-165 и VEGFA-121. Соответствие детектированных полос перечисленным изоформам VEGFA подтверждено секвенированием. Достоверное снижение экспрессии наименее активной изоформы VEGFA-189 в образцах ГК относительно соответствующих образцов неопухолевой ткани наблюдается в 17 из 20 (85%) случаев. Статистически достоверная гиперэкспрессия VEGFA-165 и VEGFA-121 в опухолевой ткани наблюдалась в 6 (30%) и 8 (40%) случаях соответственно. Выявлена положительная корреляция между гиперэкспрессией VEGFA-165 и ранним возрастом возникновения опухоли и отрицательная корреляция между уровнем экспрессии VEGFA-189 и цирротическими изменениями печени.

Повышение экспрессии наиболее активных стимуляторов ангиогенеза VEGFA-165 и VEGFA-121 в ряде образцов опухолевой ткани согласуется с описанным в литературе высоким уровнем васкуляризации ГК и является признаком опухолевой прогрессии. Нами впервые описано понижение экспрессии VEGFA-189, которая характеризуется сниженной активностью, и, вероятно, действует на альтернативные сигнальные каскады. Возможно, снижение экспрессии VEGFA-189 в опухолевой ткани способствует прогрессии ГК.

Таким образом, в работе описано характерное для ГК изменение баланса экспрессии изоформ VEGFA: понижение экспрессии VEGFA-189 и повышение экспрессии VEGFA-165 и VEGFA-121. Эта информация может быть использована для оптимизации подходов к антиангиогенной терапии ГК.

Работа частично поддержана грантом Минобрнауки (соглашение 14.607.21.0049, RFMEFI60714X0049).

Влияние фактора PARP-1 на укладку нуклеосомной ДНК
Султанов Даниэль Чингизович¹, Кудряшова Ксения Сергеевна^{1,2},
Герасимова Надежда Сергеевна¹

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²ИБХ РАН, Россия, Москва

sultanov.daniel.mol@gmail.com

Многофункциональный белковый фактор высших эукариот PARP-1 задействован во множестве внутриклеточных процессов – главным образом, в репарации и

наднуклеосомной организации ДНК. Последняя функция белка недостаточно изучена и представляет большой научный интерес в области регуляции активности генов.

В качестве модельной системы для исследования влияния PARP-1 на укладку супервитков ДНК на гистоновом коре использованы мононуклеосомы, собранные *in vitro* на нуклеосом-позиционирующей последовательности ДНК с линкерным участком длиной 20 п.н. с одной стороны. Предварительно в ДНК методом ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами вводили пару флуорофоров - донор (Cy3) и акцептор (Cy5). Структурные изменения, происходящие в нуклеосоме, изучали методом микроскопии spFRET (single-particle Förster Resonance Energy Transfer).

Методом EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Essay) исследовано связывание нуклеосом и PARP-1 в различных концентрациях. Методом spFRET микроскопии обнаружены значительные изменения в укладке супервитков ДНК на гистоновом коре при связывании с белковым фактором. Наиболее выраженные структурные перестройки наблюдались в области входа линкерной ДНК в нуклеосому. При этом структурные изменения затрагивали также ДНК вблизи ее выхода из нуклеосомы.

Продемонстрировано, что мононуклеосомы являются эффективной экспериментальной минимальной моделью для изучения взаимодействия PARP-1 с хроматином. Определены оптимальные концентрации нуклеосом и PARP1, при которых происходит образование комплексов. Установлено, что связывание PARP1 вызывает изменение укладки ДНК на гистоновом коре в областях ее входа и выхода из нуклеосомы.

Авторы благодарят д.б.н. В.М.Студитского и д.б.н. А.В.Феофанова за помощь в организации и проведении исследований.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение Минобрнауки России № 14.604.21.0063, RFMEFI60414X0063).

Новый метод поиска сайтов связывания ДНК-гиразы в геноме *Escherichia coli*

Сутормин Дмитрий Александрович, Гиляров Дмитрий Алексеевич

ИБГ РАН, Россия, Москва

sutormin94@gmail.com

Отрицательная суперспирализация молекул ДНК необходима для протекания важных клеточных процессов: транскрипции, репликации, декатенации, компактизации ДНК. У прокариот ключевым ферментом, создающим отрицательные супервитки, является топоизомераза класса II ДНК-гираза – гетеротетрамерный белок (A₂B₂), субъединицы которого кодируются генами *gyrA* и *gyrB*. Распределение ДНК-гиразы по бактериальному геному и его возможная взаимосвязь с пространственной организацией генома до сих пор не известны. В работе предложен новый метод поиска специфичных сайтов связывания ДНК-гиразы без использования искажающих данные формальдегидных сшивок. В основе метода лежит явление стабилизации ковалентных комплексов ДНК с ферментом в результате действия антибиотика ципрофлоксацина. Такие комплексы можно выделить и секвенировать связанные с ДНК-гиразой фрагменты ДНК, которые будут точно маркировать сайт связывания белка.

В экспериментах *in vitro* были использованы субъединицы А и В, конъюгированные со SPA тагом, что позволяло проводить аффинную очистку той или

иной субъединицы из реакционной смеси. Было показано специфическое совместное выделение субъединиц А и ковалентно связанных с ними фрагментов ДНК, соответствующих области сайта связывания. Разработанным методом были обнаружены “сильные” сайты связывания фермента, известные из литературы, а также найдены новые. Для валидации метода *in vivo* были использованы штаммы *E.coli* DY330, в которых хромосомные гены одной из субъединиц ДНК-гиразы слиты с последовательностями SPA-тага и трансформированные плазмидой рMP1000, несущей “сильный” сайт связывания гиразы фага Mu. При помощи ПЦР в реальном времени было продемонстрировано обогащение иммунопреципитированной ДНК последовательностями “сильного” сайта связывания ДНК-гиразы. Предварительные данные о распределении ДНК-гиразы по хромосоме *E.coli* DY330 *gyrA-SPA* были получены с помощью секвенирования библиотеки фрагментов ДНК, ковалентно связанных с GyrA, на платформе Illumina HiSeq2000.

Таким образом, нами был разработан и валидирован в системах *in vitro* и *in vivo* новый метод картирования нативных сайтов связывания ДНК-гиразы, который может быть использован для картирования сайтов связывания других прокариотических и эукариотических топоизомераз. Комплементация данных о распределении топоизомераз, основных структурных белков нуклеоида и уровня экспрессии генов (то есть активности РНК-полимеразы) с данными Hi-C позволит разработать реалистичную модель функционирования бактериального генома.

Формирование специфического противоопухолевого иммунного ответа при индукции иммуногенного апоптоза

Троицкая Ольга Сергеевна¹, Ткаченко Анастасия Викторовна²

¹ *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, факультет естественных наук, Новосибирск*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, Новосибирск
troitskaya_olga@bk.ru*

В последние десятилетия одной из успешных противоопухолевых стратегий, отличных от хирургического вмешательства, рассматривают стратегию «двойного действия», когда с одной стороны, противоопухолевый препарат напрямую индуцирует апоптоз и гибель большинства раковых клеток, а с другой стороны, активизирует иммунную систему, клетки которой далее распознают, атакуют и уничтожают раковые клетки. Белок человеческого молока лактапин, вызывающий гибель раковых клеток в культуре, может быть рассмотрен как потенциальный индуктор иммуногенной гибели клеток. В свою очередь, препараты, вызывающие иммуногенный апоптоз, могут быть использованы для разработки противоопухолевых вакцин.

Изучение рекомбинантного аналога лактапина (RL2) в качестве индуктора иммуногенной гибели клеток было задачей исследования.

Иммуногенный апоптоз характеризуется определенными молекулярными событиями, происходящими в клетках: экспозицией калретикулина на внешнюю плазматическую мембрану, увеличением уровня внеклеточного АТФ и выходом белка HMGB1 во внеклеточное пространство. В данном исследовании методом проточной цитометрии мы показали, что при инкубации раковых клеток MCF-7, MDA-MB-231 и

MX7 с RL2 происходит увеличение популяции клеток, экспонирующей калретикулин на внешней клеточной мембране, что характерно для иммуногенного апоптоза. Также показано увеличение уровня внеклеточного АТФ после инкубации клеток MDA-MB-231 и MX7 с RL2 в течение 20-24 ч. Методом вестерн-блота было обнаружено уменьшение клеточного эндо-НМGB1 в процессе инкубации с RL2. Таким образом, в экспериментах *in vitro* показана индукция иммуногенного апоптоза аналогом лактапина.

Для исследования эффекта вакцинации опухолевыми клетками, обработанными аналогом лактапина RL2, использовали клетки рабдомиосаркомы мышей MX7, которые трансплантировали сингенным мышам линии СЗН. В качестве препарата сравнения использовали доксорубин. Эффект вакцинации оценивали по выживаемости иммунизированных мышей после вторичной трансплантации опухолевых клеток. Выживаемость вакцинированных животных в финальной точке эксперимента составила 100% (обработка доксорубицином) и 67% (обработка RL2). На момент окончания эксперимента в группе RL2 опухоли отсутствовали у 75% мышей, для группы с доксорубицином – у 50% животных. Таким образом, в экспериментах на животных показано, что рекомбинантный аналог лактапина способен к индукции иммуногенного апоптоза *in vivo*.

Работа проводилась при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-01232 А.

Исследование микроцин-С-подобного вещества, закодированного в опероне *Yersinia pseudotuberculosis*

Цибульская Дарья Сергеевна

ИБГ РАН, РФ, Москва

650460@gmail.com

В связи с увеличением количества патогенных микроорганизмов, устойчивых к существующим антибиотикам, поиск и исследование новых антибактериальных веществ является актуальной задачей для научных исследований. Одним из перспективных направлений является исследование природных антибиотиков, например микроцина С и микроцин-С-подобных соединений. Микроцин С (EMcC)- это пептид-нуклеотидный рибосомально синтезируемый бактериоцин, подвергающийся посттрансляционным модификациям. Он продуцируется штаммами *Escherichia coli* и подавляет рост некоторых энтеробактерий. Гены, ответственные за синтез, модификации, транспорт, внутреннюю иммунность клетки-продуцента, образуют микроциновый оперон. В результате биоинформатического анализа были предсказаны предполагаемые микроцин-С-подобные опероны (*mcc*-подобные опероны), в том числе оперон, закодированный в геноме *Yersinia pseudotuberculosis*. Цель настоящей работы – исследование микроцин-С-подобного вещества, закодированного в этом опероне. Для этого были созданы рекомбинантные векторы, содержащие полноразмерный *mcc*-подобный оперон *Y. pseudotuberculosis*, а также усеченные варианты такого оперона. Оперон *Y. pseudotuberculosis* сильно отличается от оперона кишечной палочки: предшественник микроцина длиннее (42 аминокислоты), генов в опероне больше, что предполагает возможность дополнительных модификаций пептид-нуклеотида. Было показано, что при экспрессии такого оперона в клетках кишечной палочки, продуцируется антибактериальное вещество. После ряда экспериментов в системе *in vivo* и с рекомбинантными белками в системе *in vitro*, мы пришли к выводу, что исследуемое вещество уникально по своей химической структуре и

отличается от ЕМсС как пептидной, так и нуклеотидной частями. Кроме того, нами были обнаружены новые, ранее неизученные модификации. Однако, клеточная мишень антибиотика, как и в случае ЕМсС, оказалась аспартил-тРНК-синтетаза. Таким образом, нами получено новое антибактериальное вещество, закодированное в геноме *Y. pseudotuberculosis*. Механизм синтеза и процессинга этого антибиотика пока не до конца понятен, и именно это и предстоит выяснить нам в дальнейшем.

Выявление белков, формирующих детергент-устойчивые агрегаты в тканях мозга крысы (*Rattus norvegicus*)

Шенфельд А.А., Сонова Ю.В., Галкин А.П.

Санкт-Петербургский государственный университет,

Россия, Санкт-Петербург

shenaleksandr@mail.ru

Амилоиды представляют собой поперечно исчерченные фибриллярные белковые агрегаты. Патологическое накопление амилоидных агрегатов является непосредственной характеристикой целого ряда социально значимых нейродегенеративных заболеваний. Однако, помимо патологических амилоидов, у ряда организмов выявлены также функциональные амилоиды, участвующие в регуляции жизненно-важных процессов.

В нашей лаборатории был разработан и апробирован метод протеомного скрининга, позволяющий идентифицировать амилоиды различных организмов. Данный метод основан на выделении из исследуемой ткани фракции детергент-устойчивых белков, с последующей их идентификацией с помощью масс-спектрометрии. В своей работе мы использовали указанную методику с целью выявления ранее не охарактеризованных амилоидных агрегатов в мозге крысы (*Rattus norvegicus*).

В данном протеомном скрининге был выявлен ряд нейроспецифических белков, часть из которых непосредственно задействована в синаптической трансмиссии, в том числе долговременной потенциации. Среди них наибольший интерес для нас представляют белки: NSF, FXR1 и STXB1. Данные белки были выявлены во всех исследуемых образцах с высокой степенью достоверности. С помощью биоинформатического анализа мы установили, что указанные белки имеют потенциально амилоидогенные регионы. Исходя из функциональных особенностей, пространственной организации, а также наличия амилоидогенных регионов, указанные белки являются наиболее перспективными кандидатами на роль функциональных амилоидов.

Способность белка FXR1 формировать амилоидные фибриллы *in vitro* была показана ранее другими исследователями. На основании наших данных мы полагаем, что FXR1 является функциональным амилоидом, и планируем проверить эту гипотезу в дальнейших экспериментах. Результаты, полученные в этом проекте, могут иметь важное фундаментальное значение. Изучение функциональных амилоидов является новым и приоритетным научным направлением, позволяющим расширить наши представления о значимости амилоидов в регуляции физиологических процессов.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке РФФ 14-50-00069 и РФФИ 14-04-01463.

**Диагностика фитопатогенных пектолитических бактерий *Dickeya* spp.
с помощью петлевой изотермической амплификации
Ширшиков Ф.В.¹, Мирошников К.К.², Кабанова А.П.¹, Баранник А.П.¹,
Игнатов А.Н.³**

¹ФГБУН Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

³ФГБУН «ВНИИ фитопатологии», Московская обл., Большие Вяземы
shrshkv@ya.ru

Пектолитические бактерии *Dickeya* spp. представляют собой одну из главных причин возникновения у картофеля таких заболеваний как чёрная ножка и мягкая гниль. Эти фитопатогены способны поражать картофель как на стадии вегетации, так и во время хранения урожая, и приводят к значительным экономическим потерям. Характерной особенностью представителей рода *Dickeya* является биосинтез и секреция на твёрдой питательной среде пигмента индигоидина. Целью настоящей работы стало создание диагностического теста для идентификации *Dickeya* spp. в биопробах на основе метода петлевой изотермической амплификации (LAMP). В качестве молекулярно-генетического маркера был выбран консервативный участок гена *indC*, ответственного за биосинтез пигмента индигоидина. Для достижения поставленной цели решались задачи по дизайну праймеров, оптимизации условий проведения реакции и детекции сигнала, а также тестирование коллекции штаммов фитопатогенов картофеля на принадлежность к таксону *Dickeya*.

В ходе проведённых исследований было протестировано более 100 штаммов бактерий, изолированных из почвы посевных площадей и поливной воды ООО «Дока-генные технологии» (Дмитровский р-н, Московская область), а также полученных из музейной коллекции микроорганизмов ВНИИ фитопатологии. В качестве положительного контроля использовали плазмиду, содержащую фрагмент гена *indC*, клонированного из подтверждённого методом секвенирования гена 16S рРНК штамма *D. solani*. По результатам тестирования 40 образцов дали положительные реакции. Разработанные праймеры обладают селективностью в отношении целевого таксона, о чём свидетельствуют отрицательные результаты реакции амплификации на штаммах других бактерий, в том числе близкородственных пектолитических бактерий *Pectobacterium atrosepticum* и *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Таким образом, нами разработан и протестирован способ идентификации пектолитических бактерий *Dickeya* spp., который может быть рекомендован для использования в широкомасштабной полевой диагностике, а также в сравнительно низкобюджетных отраслях сельского хозяйства.

Работа поддержана грантом РНФ 16–16–00073 и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Выражаем глубокую признательность за предоставленную коллекцию штаммов ООО «Дока-генные технологии» и ФГБУН «ВНИИФ», а также научному руководителю проекта — д. х. н. К.А. Мирошникову.

Влияние уменьшения экспрессии рецепторов дофамина d1 в миндалине на уровень условнорефлекторного страха крыс

Аксенова Ю.В.¹, Брошевицкая Н.Д.¹, Рысакова М.П.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Россия, Москва
уу.aurum@yandex.ru

Известно, что дофаминергические влияния от клеток вентрального тегмента к миндалине вызывают усиление условнорефлекторного страха за счет торможения ГАМКергических интернейронов, находящихся в паракапсулярных скоплениях. Задачей нашей работы было изучить влияние длительного уменьшения числа рецепторов дофамина D1 с помощью локальной лентивирусной трансдукции в базолатеральной миндалине крыс на уровень условнорефлекторного страха. Сотрудниками лаборатории молекулярной нейробиологии ИВНД были синтезированы лентивирусные конструкции на основе вируса иммунодефицита человека, которые способны доставить в клетку два коротких интерферирующих участка РНК, блокирующих экспрессию генов рецептора D1 (sh1D1 и sh3D1). В качестве контроля использовали лентивирусные конструкции, не нарушающие экспрессию генов рецепторов (scr). Опыты проводили на 36 крысах самцах Вистар, 10-ти животным вводили рабочий вирус sh1D1, 11-ти – рабочий вирус sh3D1, 15-ти - контрольный. Суспензию лентивирусов вводили в базолатеральную миндалину крыс (AP=-2.8, L=4.8, H=8.5) в процессе хирургической операции в объеме 2 мкл со скоростью 0.25 мкл/мин с помощью шприца Гамильтона с иглой диаметром 0.33 мм. Иглу вынимали через 10 мин после окончания введения. Опыты начинали через 7-10 дней после операции. Исследовали влияние введения вирусов на проявление и угашение ранее выработанного классического Павловского оборонительного условного рефлекса, а также повторное обучение. Анализировали процент времени замирания до и после действия стимулов. Во время морфологического контроля область заражения определяли по свечению метки GFP на флуоресцентном микроскопе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у крыс с вирусом как sh1D1, так и sh3D1 условнорефлекторный страх угасался быстрее, а повторное обучение было менее эффективным по сравнению с животными с контрольным вирусом (scr). Вместе с тем, введение вируса sh1D1 и sh3D1 не меняло проявление рефлекса, выработанного до операции. Наибольшие изменения в поведении после введения вирусов наблюдались у крыс с большим процентом времени замирания (>70%). Таким образом, лентивирусная трансдукция обеспечивала длительные изменения (до 30 дней) в условнорефлекторной деятельности крыс и может использоваться в качестве нефармакологического метода для ускорения угашения страха, что важно для разработок путей лечения посттравматических стрессовых расстройств у человека.

Движения глаз пианистов при чтении с листа музыкального текста

Бойко Любовь Алексеевна, Иванченко Дарья Кирилловна,

Терещенко Леонид Викторович

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

lulu.boyko@yandex.ru, dariaivanchenko@yandex.ru, lter@mail.ru

Чтение нот с листа – это уникальная человеческая деятельность, на примере которой можно изучать одновременно протекающие сложные когнитивные процессы (восприятие информации с незамедлительным ее воспроизведением) с использованием метода видеорегистрации взора. Наибольший интерес представляют особенности чтения двустрочного нотного текста, так как в своей повседневной деятельности пианисты исполняют главным образом двустрочным текст фортепианной музыки, который имеет как горизонтальное, так и вертикальное измерение. Поэтому в нашей работе мы исследовали характеристики зрительно-моторной деятельности пианистов во время чтения двустрочных нот с листа.

Нами разработана оригинальная методика регистрации движений глаз без фиксации головы, которая позволяет изучать параметры движений глаз при непосредственном воспроизведении нот. Эти процессы составляют сложную зрительно-моторную деятельность в условиях естественного воспроизведения музыкального произведения. Во время чтения нотного текста нами проанализированы следующие параметры движений глаз: количество и длительность фиксаций, амплитуда саккад, количество вертикальных и горизонтальных саккад, количество ошибок воспроизведения, а также зрительно-моторная задержка (ЗМЗ), которая отражает количество знаков между читаемой (по позиции глаза) и воспроизводимой на клавиатуре (по аудиограмме) нотами. При чтении более простого произведения пианисты совершают большее количество менее длительных фиксаций. При чтении более сложного произведения закономерность обратная. Средняя амплитуда саккад, совершаемых во время чтения музыкального текста, варьирует в пределах 1-2 градусов. Нами не выявлено достоверных отличий в соотношении горизонтальных и вертикальных саккад для полифонического и гомофонического произведений. Величина ЗМЗ в основном составляет 2-3 символа. Кроме того, показана достоверная корреляция между ЗМЗ и количеством ошибок, которые совершает пианист при чтении нотного текста.

Результаты исследования могут быть использованы для оценки исполнительского искусства у музыкантов и учащихся музыкальных учебных заведений любого уровня, а также для разработки методик более эффективного начального обучения пианистов.

Роль рецепторов серотонина 5ht1a в базолатеральном ядре миндалины в модуляции высокого и низкого уровня тревожности крыс

Брошевицкая Н.Д.¹, Аксенова Ю.В.¹, Рысакова М.П.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

*²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Россия, Москва*

multibroshka@mail.ru

В пределах одной популяции встречаются животные с высоким и низким уровнем тревожности, что, как мы предполагаем, объясняется различиями в нейромедиаторной передаче на уровне эмоциогенных структур мозга у данных групп животных. Известно,

что серотонинергические влияния от ядер шва на миндалину модулируют уровень тревожности. Активация в миндалине рецепторов серотонина 5HT1A приводит к уменьшению тревожности, а 5HT2A/C рецепторов – к увеличению.

В задачу работы входило исследование влияния локального введения агониста и антагониста 5HT1A рецепторов в базолатеральное ядро миндалины на поведение высоко- и низкотревожных крыс в тестах на тревожность и паникоподобное поведение. Опыты проводили на 63 крысах самцах Вистар. Использовали приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), приподнятый Т-образный лабиринт (ПТЛ) и темно-светлую камеру (ТСК). В зависимости от процента времени выходов в открытые рукава ПКЛ или светлый отсек ТСК после первого тестирования животных делили на группы высоко- (ВТ) и низкотревожных (НТ). Для введения веществ в миндалину были вживлены направляющие с находящимися внутри канюлями. За 10 мин до повторного поведенческого тестирования в миндалину вводили агонист (8-ОН-ДРАТ, 0.3 мкг/0.5 мкл), либо антагонист (WAY-100635, 0.2 мкг/0.5 мкл) 5HT1A рецепторов, либо физиологический раствор (контроль, 0.5 мкл). После окончания опытов проводили морфоконтроль для локализации кончиков канюль.

В ПКЛ введение агониста оказывало анксиолитическое действие на НТ крыс, при этом увеличивалось длительность выходов в открытые рукава. Антагонист оказывал анксиогенное действие в ПКЛ на ВТ крыс, при этом увеличивался латентный период выходов в открытые рукава. В ПТЛ агонист оказывал антипаническое действие на НТ, увеличивая латентный период входа в закрытый рукав из открытого. В ТСК происходило увеличение числа дефекаций под влиянием антагониста и уменьшение числа уринаций после введения агониста. Таким образом, группы ВТ и НТ животных обладали различной чувствительностью к введению препаратов: НТ лучше реагировали на введение агониста, ВТ – на введение антагониста. Полученные результаты могут быть связаны с разным числом рецепторов 5-HT1A или разным количеством выделяемого серотонина в миндалине у ВТ и НТ крыс.

Результаты фундаментального исследования эффективности гипоксического посткондиционирования при коррекции постгипоксических патологий мозга

Ветровой Олег Васильевич, Сариева Ксения Владимировна

Санкт-Петербургский Государственный Университет, биологический факультет

ФГБУН Институт Физиологии имени И.П.Павлова РАН,

Россия, Санкт-Петербург

vov210292@yandex.ru

Посткондиционирование – направленное на мобилизацию врожденных адаптивных механизмов предъявление экстремального воздействия умеренной интенсивности особям, пережившим повреждающее воздействие. В нашей лаборатории разработан неинвазивный способ посткондиционирования с использованием умеренной гипобарической гипоксии (ПостК).

В пилотных исследованиях было установлено, что ПостК эффективно предотвращает гибель нейронов гиппокампа и неокортекса крыс (морфологический анализ; оценка фрагментации ДНК), переживших тяжелую повреждающую гипоксию (ТГ), нормализует активность процессов перекисного окисления липидов (ТБК-активные продукты, Шиффовы основания), гормональной системы (базальный и стрессорный

уровень кортикостерона; экспрессия кортиколиберина, глюко- и минералокортикоидных рецепторов в экстрагипоталамических структурах мозга) и поведение (исследовательская деятельность (тест «Открытое Поле»); тревожность (тест «Приподнятый Крестообразный Лабиринт»)).

На следующем этапе работы было картировано содержание нейротрофина BDNF, противоапоптотического белка Bcl-2, транскрипционных факторов NIF1a и NIF3a, цитокина эритропоэтина, а также фактора терминальной дифференцировки нейроэпителиальных клеток в нейроны NeuroD2, одного из эффекторов эритропоэтин-опосредованного сигнального каскада, в полях гиппокампа и неокортекса крыс в течение четырех суток после ТГ и в процессе предъявления сеансов ПостК.

На основании накопленных данных сделано заключение о высочайшей перспективности метода ПостК для внедрения в клиническую практику.

Работа поддержана грантами РФФИ (№13-04-00532, №16-34-00027).

Морфологические особенности нейронов, функционально активных при обучении обстановочному страху у мышей

Волыничков Зосим Николаевич

ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», ФГБНУ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Россия, Москва

mr.zosimus@yandex.ru

Динамика дендритных шипиков, актин-содержащих выростов мембран дендритов, способных образовывать синаптические соединения, считается основным механизмом долговременной памяти. Для картирования клеточных субстратов долговременной нейрональной пластичности широко используют в качестве маркеров экспрессию немедленных ранних генов (напр., *c-fos*, *zif-268* и *Arc/Arg 3.1*). Однако до сих пор остается малоизученной динамика дендритных шипиков тех нейронов, в которых при обучении активировались молекулярные маркеры пластичности. В единичных работах было показано, что в *c-fos* и *arc*-положительных нейронах после обучения в поле CA1 гиппокампа снижалась плотность дендритных шипиков.

Целью настоящей работы было исследовать изменения плотности дендритных шипиков *c-Fos+*, *c-Fos-*, *Zif/268+* и *Zif/268-* пирамидных нейронов V-VI слоев моторной коры и поля CA1 гиппокампа в мозге мышей через 2 ч после обучения условно-рефлекторному замиранию на обстановку («обучение») либо напоминания обстановкой («напоминание») либо обследования обстановки («активный контроль»). Подсчет плотности дендритных шипиков на срезах мозга мышей трансгенной линии *Thy-1-EGFP*, окрашенных иммуногистохимически антителами к *c-Fos* и *Zif/268*, проводили в программе *NeuroLucida* (MBF Bioscience).

Показано, что *Zif/268+* нейронах моторной коры в группе «напоминание» плотность дендритных шипиков была достоверно ниже, чем в группах «обучение» и «активный контроль». В поле CA1 гиппокампа плотность дендритных шипиков была достоверно выше в группе «напоминание», чем в группах «обучение» и «активный контроль». В *c-Fos+* нейронах моторной коры различий между группами не обнаружено, а в поле CA1 гиппокампа в группах «обучение» и «напоминание» плотность дендритных шипиков была достоверно ниже, чем в группе «активный контроль». В моторной коре в группах «обучение» и «активный контроль» в *c-Fos+* нейронах плотность дендритных

шипиков была достоверно выше по сравнению с Zif/268+ нейронами. Анализ Шолля показал, что в группе «напоминание» c-Fos+ нейроны имели достоверно больше пересечений с концентрическими кольцами на расстоянии в 20 и 40 мкм от тела нейрона в поле CA1 гиппокампа и на расстоянии от 60 до 110 мкм в моторной коре.

Таким образом, на основании того, что плотность дендритных шипиков в c-Fos+ нейронах выше, чем в Zif/268+, а также того, что c-Fos+ нейроны имеют большую сложность ветвления дендритного дерева по сравнению с Zif/268+ нейронами, можно предположить, что транскрипционные факторы c-Fos и Zif маркируют разные субпопуляции нейронов.

Перспективы использования модели сенсорного контакта на дрозофиле

Гончарова Анна Алексеевна

ФГБУН Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН,

Россия, Санкт-Петербург

AnemoneNemorosa@yandex.ru

Модель сенсорного контакта, разработанная Н. Н. Кудрявцевой, подразумевает под собой продолжительное содержание мышей в смежных половинах клетки, разделенных прозрачной перфорированной перегородкой, с ежедневными кратковременными агонистическими контактами между особями, возникающими после поднятия перегородки. В результате каждая особь приобретает черты агрессивного или субмиссивного поведения. В зависимости от приобретенного опыта (победы или поражения) наблюдаются изменения различных форм поведения и психоэмоционального состояния животных: раздражительность, тревожность, увеличение агрессии, снижение либидо у «победителя»; страх, подавление исследовательского поведения, снижение массы тела и тестостерона у «жертвы». Происходящие нарушения в дальнейшем приводят к развитию у мышей тяжелых психических и психосоматических заболеваний. Полагают, что именно запаховые сигналы от особей играют в данной модели ключевую роль.

Наши исследования, проведенные на особях *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S, показали, что содержание самцов в однополых группах по 20 особей в течение 3 суток после вылупления приводит к сильному (до 3-х раз) и длительному (до 5 суток после изоляции из группы) подавлению их двигательной активности при индивидуальном тестировании по сравнению с самцами, содержащимися поодиночке. Также было показано, что в тесте с самкой содержащиеся в группе самцы стремятся избежать физических контактов, что приводит к увеличению побегки и снижению интенсивности ухаживания за самкой (различия пропадают через сутки после изоляции самцов из группы). Оказалось, что именно феромоны, продуцируемые самцами, в частности цис-вакценил ацетат, являются агентами, модифицирующими поведение насекомых при содержании их в группе.

Мы предполагаем, что групповое содержание самцов дрозофилы, т.е. приобретение ими социального опыта, приводит не только к внешне схожим с наблюдаемым у мышей в модели сенсорного контакта изменениям поведения, но и имеет в своей основе аналогичные нейробиологические механизмы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02153.

Этапы формирования депрессивно-подобного состояния у крыс, вызванного хроническим воздействием ультразвука переменных частот

Горлова А.В.¹, Павлов Д.А.¹, Ушакова В.М.¹, Иноземцев А.Н.¹, Зубков Е.А.², Чехонин В.П.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Россия, Москва

anna.gorlova204@gmail.com

Считается, что в ближайшем будущем депрессия может стать главной причиной нетрудоспособности. Поэтому изучение механизмов формирования депрессивного состояния и создание адекватной модели депрессивно-подобного состояния у экспериментальных животных являются актуальными проблемами настоящего времени. Ультразвуковая модель впервые использует основной стрессирующий фактор, воздействующий на человека в современном обществе, – ситуацию хронической информационной неопределенности.

В работе использовался ультразвуковой генератор Weitech WK-0300, случайным образом подающий частоты, несущие для крыс противоположную мотивационную нагрузку (диапазон 20-45 кГц). Данный метод позволяет проводить сравнительное тестирование животных, находящихся на разных этапах развития депрессивно-подобного состояния. В использованном протоколе самцы крыс линии Sprague-Dawley подвергались хроническому ультразвуковому воздействию в течение 1, 2 и 3 недель.

Крысы, подвергавшиеся ультразвуковому воздействию в течение одной недели, показали значительные отклонения от контрольной группы в тестах социальный интерес и резидент-интродер (уменьшение числа социальных контактов и уменьшение их средней продолжительности, увеличение числа агрессивных столкновений).

Крысы, подвергавшиеся ультразвуковому воздействию в течение двух недель, помимо описанных нарушений, также продемонстрировали повышенную тревожность и сниженную исследовательскую активность в тестах открытое поле, светло-темная камера и приподнятый крестообразный лабиринт. Кроме того, время их иммобильности в тесте вынужденного плавания по Порсолту было достоверно больше по сравнению с результатами контрольной группы.

Крысы, подвергавшиеся ультразвуковому воздействию в течение трех недель, также показали когнитивные нарушения в тесте распознавания объектов.

Проведенное сравнение позволило определить последовательность возникающих отклонений, сопровождающих развитие депрессивно-подобного состояния, и сделать следующие выводы: 1) Хроническое воздействие ультразвука переменных частот приводит к развитию депрессивно-подобного состояния у крыс, причем длительность экспозиции влияет на специфику регистрируемых нарушений; 2) Первые отмеченные нарушения затрагивают сферу коммуникации; затем, по мере усугубления депрессивно-подобного состояния, развивается повышенная тревожность и снижение двигательной активности. В последнюю очередь проявляются когнитивные нарушения.

Таким образом, различный протокол воздействия ультразвука переменных частот позволяет определить у крыс стадии развития депрессивно-подобного состояния, что в дальнейшем может стать основой для новых исследований, посвященных формированию депрессивно-подобных состояний экспериментальных животных и депрессии человека.

Особенности саккадических ответов у больных с диагнозом ультравысокого риска развития шизофрении в парадигме «go/no go»

Котенев А.В.¹ Карелин С.А.¹, Тобышев А.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

^{1,2}ФГБУ «Центр психического здоровья», Москва

Саккадические движения глаз как компонент зрительного восприятия и внимания являются адекватной моделью для изучения когнитивного контроля двигательного поведения человека, как в норме, так и при различных психических заболеваниях. Многочисленные нарушения когнитивной сферы отражаются в изменениях параметров саккадических ответов.

Для изучения мозговых механизмов нарушения когнитивного контроля глазодвигательного поведения, включающего процессы восприятия, внимания, принятия решения и произвольного торможения, у больных с ультравысоким риском развития шизофрении использовали экспериментальную схему «go/ no go». Исследование проведено на 15 больных с ультравысоким риском развития шизофрении и 15 здоровых испытуемых (мужчин правшей). Движения глаз регистрировали с помощью ЭОГ. На группе больных проводили дополнительное обследование с помощью МРТ методов.

В группе больных обнаружено увеличение числа ошибочных саккад на тормозные стимулы («no go») и уменьшение величины ЛП правильных саккад на «go» стимулы по сравнению со здоровыми испытуемыми ($p < 0.001$). Величина ЛП ошибочных саккад на «no go» стимулы была меньше, чем на «go» стимулы, как для больных, так и для здоровых ($p < 0.001$, на 74 ± 12 мс и 42 ± 9 мс, соответственно). Установлена противоположная латерализация ЛП саккад в двух исследуемых группах: у здоровых испытуемых ЛП саккад вправо на «go» стимул был меньше, чем влево, а у больных наоборот – ЛП саккады влево был меньше, чем вправо ($p < 0.05$).

МРТ исследование установило, что уменьшение величины ЛП саккад на «go» стимул у больных в парадигме «go/no go» коррелирует с увеличением объема серого вещества фронтальной, теменной и височной коры, что возможно отражает компенсаторные механизмы в доманифестационный период развития шизофрении. Использование метода диффузионно-взвешенной томографии выявило снижение показателя фракционной анизотропии височной части правого верхнего продольного пучка у больных. Эти данные свидетельствуют о микроструктурной патологии проводящих путей головного мозга, что может лежать в основе найденных нейрофизиологических различий, отражающих снижение сенсорной переработки, внимания и нарушение тормозного контроля у больных с ультравысоким риском развития шизофрении.

Работа выполняется при поддержке Грантов РФФИ № 14-04-01634 и № 16-04-01079.

Динамика пространственно-временных характеристик ЭЭГ в процессе решения вербальных и невербальных задач

Кундупьян Юлия Леонтьевна

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
имени Д.И. Ивановского, Россия, Ростов-на-Дону*

julia_leo@mail.ru

Межполушарные отношения, возникающие в процессе выполнения вербальных и невербальных задач, могут влиять на эффективность и качество деятельности, а также на паттерны ЭЭГ. Индивидуальные особенности фоновых ритмов ЭЭГ отражают характер регуляторных процессов, обеспечивающих координацию внутрикорковых и короково-подкорковых взаимоотношений, общее состояние мозга. Однако существуют противоречивые данные о характере межполушарных отношений при решении вербальных и невербальных задач. Целью нашего исследования было изучить динамику времени реакции (ВР), спектральные характеристики ЭЭГ и уровень когерентности при решении когнитивных задач.

В исследовании принимало участие 35 человек, средний возраст – 25 лет. В качестве модели деятельности использовали вербальные и невербальные задачи. Каждый обследуемый должен был проанализировать 100 слайдов для каждой задачи, исключая неподходящее по смыслу слово или картинку на слайде. Во время выполнения теста регистрировали ВР, ЭЭГ. Оцифрованная ЭЭГ и ВР экспортировались в программную среду MATLAB, где проводилась дальнейшая обработка сигналов.

Анализ ВР показал, что невербальные задачи человек решал быстрее и эффективнее при использовании левой руки, а для решения вербальных задач обследуемые использовали 2 стратегии распознавания (быстрые реакции, требующие нажатия правой рукой и быстрые реакции, требующие нажатия левой рукой). По результатам спектральных характеристик ЭЭГ, было обнаружено, что в процесс эффективного решения когнитивных задач одновременно вовлекались механизмы передней и задней систем внимания. Эффективное решение невербальных задач сопровождалось более высоким уровнем когерентности в лобно-теменных отведениях правого и левого полушарий, а также теменно-затылочной области правого полушария в диапазоне дельта- и бета-активности.

Таким образом, вероятно, что решение вербальных и невербальных задач контролируется разными механизмами функциональной межполушарной асимметрии, что проявляется в наличии фронтально-окципитальной асимметрии в диапазоне изучаемых ритмов, также повышенным уровнем когерентности внутри правого полушария при решении невербальных задач. Кроме фронтально-окципитальной асимметрии в диапазоне изучаемых ритмов наблюдалась латеральная асимметрия в диапазоне альфа-ритма.

«Анксиолитический» эффект удаления обонятельных луковиц у мышей в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта» связан с гиперлокомоцией

Недогреева О.А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Институт высшей нервной деятельности РАН, Россия, Москва

nedogreevaolga@gmail.com

Удаление обонятельных луковиц у лабораторных грызунов приводит к значительным изменениям в поведении и в работе медиаторных систем головного мозга, а также к нейродегенеративным процессам. Наблюдаемые изменения невозможно полностью объяснить исключительно потерей обоняния. Эту экспериментальную модель часто используют для моделирования симптомов нейродегенеративных заболеваний и клинической депрессии. В этой работе были исследованы проявления тревожности и депрессивно-подобного поведения у самцов мышей линии C57Bl/6 через 1 мес. после удаления обонятельных луковиц (бульбэктомии [БЭ]). БЭ осуществляли путем аспирации обонятельных луковиц под хлоралгидратным наркозом. Через 1 мес. после операции исследовали показатели локомоторной и исследовательской активности в тесте «Открытое поле» (ОП) и тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Оценку депрессивно-подобного поведения проводили с помощью теста вынужденного плавания по Порсолту. Кроме того, определяли уровень экспрессии фактора роста нервов (ФРН) в гиппокампе и новой коре животных. Содержание ФРН определяли методом Вестерн-блот. Было установлено, что в тесте ОП мыши после БЭ демонстрировали более высокую двигательную активность по сравнению с мышами контрольной группы. В тесте ПКЛ мыши после БЭ достоверно чаще, чем контрольная группа, выходили в центр и в светлые рукава, совершали свешивания и выглядывания из темных рукавов в светлые. В тесте вынужденного плавания мыши после БЭ и животные контрольной группы демонстрировали сходное поведение. Таким образом, «анксиолитический» эффект БЭ, который наблюдался у мышей в тесте ПКЛ можно объяснить общим повышением локомоторной активности, но не уменьшением тревожности. Уровень ФРН в гиппокампе мышей после БЭ был достоверно снижен на 23% по сравнению с контрольной группой. Это позволяет предположить, что вызванные БЭ изменения поведения могут быть связаны в том числе и с нарушением трофического обеспечения головного мозга.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 16-04-01054-а.

Семантическая неопределенность среды как триггер патологической агрессии: зоосоциальный аспект

Павлов Дмитрий Александрович¹, Горлова Анна Вячеславовна¹, Ушакова Валерия Михайловна¹, Иноземцев Анатолий Николаевич¹, Зубков Евгений Андреевич², Чехонин Владимир Павлович²

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В. П. Сербского, Россия, Москва

Рецидивная агрессия часто сопровождается многочисленными психопатологиями, такие как обсессивно-компульсивный синдром, болезнь Альцгеймера, эпилепсию, посттравматический стресс и шизофрению. Недостаточная изученность механизмов

рекурсивной агрессии и подходов к коррекции девиантных форм поведения определяет актуальность разработки животных моделей данных патологий. В рамках данного исследования использовался новый способ инициирования агрессии – ультразвуковая модель (УЗ-модель).

Излучатель переменных УЗ-частот (20- 45 кГц) случайным образом в течение 3-х недель подавал сигналы, имеющие важные семантические значения в социальном конспецифическом взаимодействии грызунов. Стохастическое распределение различных по семантической значимости частот создавало информационную неопределенность, которая стрессировала животных. Затем проводилась батарея поведенческих тестов, направленных на определение уровня агрессии, тревожности и нарушений памяти.

В тестах принимали участие три линии мышей (СВА, BALB/c, C57BL/6 – перечислены в порядке увеличения генетической склонности к агрессии), при этом показано, что у неагрессивных и среднеагрессивных мышей под действием УЗ переменных частот увеличивалось количество агрессивных контактов с конспецификом, при этом снижалось латентное время первого агрессивного контакта. Подсадка ювенильного самца выявила наличие патологической агрессии у мышей данных линий. При этом в рамках данной модели у C57BL/6 животных агрессия снижалась, а латентное время первой атаки возрастало. Корреляционный анализ связи уровня агрессии и уровня тревожности не выявил статистически значимых различий. Тесты на память и способность к обучению до и после патологической агрессии выявили статистически значимые нарушения кратковременной и долговременной памяти у патологически агрессивных животных.

Таким образом, нами было показано важное преимущество УЗ-модели по отношению к другим моделям патологической агрессии: трехнедельный протокол является достаточным временным интервалом для данной цели. Корреляции между генетической предрасположенностью к агрессии, способностью к обучению и уровнем тревожности в норме и патологии являются важными результатами для поиска предикторов агрессивных состояний. Выводы работы: 1) хроническое действие УЗ переменных частот инициирует патологическую агрессию у неагрессивных линий мышей и снижает агрессивность у линии, предрасположенной к агрессии; 2) Уровень агрессии не зависит от уровня тревожности животного; 3) Патологическая агрессия нарушает процессы обучения и памяти.

Изменения структуры дневного сна, вызванные подпороговой электрокожной стимуляцией с частотой 1 гц

Полищук А.А.^{1,2}, Лукьянова Е.А.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

*²ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН,
Россия, Москва*

www.aleksa.95@mail.ru

Сон - особое состояние человека и животных, включающее в себя ряд стадий, закономерно повторяющихся в течение ночи (при нормальном суточном графике), которое имеет решающее значение для поддержания жизни. Даже частичное лишение сна приводит к ряду функциональных расстройств. Поэтому разработка и совершенствование методов коррекции расстройств сна весьма актуальна. В настоящее время интенсивно

разрабатываются методы неинвазивного воздействия на качество сна, путем транскраниальной и периферической стимуляции во время медленноволновой стадии сна.

Целью нашей работы являлось изучение возможности улучшения качества 3-й стадии дневного сна посредством подпороговой электрической стимуляции срединного нерва руки с частотой 1 Гц (частота дельта-ритма ЭЭГ).

В исследовании приняли участие 16 человек в возрасте от 19 до 25 лет, 10 мужчин и 6 женщин. Эксперименты проводились в послеобеденное время. Для регистрации полисомнограммы крепились электроды. У каждого испытуемого определялся порог для электрической стимуляции срединного нерва руки. Затем следовал дневной сон, продолжавшийся 1 час. Во время 3-й стадии сна на кожу предплечья подавались подпороговые электрические импульсы с частотой 1 Гц сериями по 30 сек с 30-секундной паузой между сериями. Каждый испытуемый участвовал в двух экспериментах: основном (со стимуляцией во время сна) и контрольном (со сном без стимуляции), между экспериментами делался перерыв в течение недели.

При анализе структуры дневного сна было установлено, что у всех испытуемых в течение 20 минут после выключения света наступала 2-я стадия сна. У 14 человек в двух экспериментах (и в опытном, и в контрольном) регистрировалась, в том числе, и 3-я стадия сна. У двух испытуемых 3-я стадия была отмечена только в одном из двух экспериментов, эти данные были исключены из анализа. У 7 испытуемых присутствовала также фаза парадоксального сна.

Показано, что стимуляция не вызвала значимых изменений 3-й стадии сна, но наблюдалось достоверное уменьшение латентности парадоксального сна. Уменьшение латентности парадоксальной фазы, вероятно, объясняется тем, что подпороговые электрокожные сигналы могут оказывать активирующее влияние на центры регуляции парадоксального сна и ускорять его наступление.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ №14-36-01342a2

Самоузнавание в зеркале у серых ворон: тест Гэллапа

Самулеева Мария Владимировна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

samuleeva@gmail.com

Узнавание своего отражения в зеркале связывают со способностью формировать образ самого себя («Я-концепция»). Самоузнавание требует высокого уровня развития мозга и мышления: этой способности нет у детей младше 18-24 месяцев; она может отсутствовать у людей с аутизмом и шизофренией; среди животных ее обнаружили лишь у некоторых высокоорганизованных млекопитающих (у человекообразных обезьян, слонов и дельфинов), а также у сорок. Для оценки этой способности у животных используют предложенный Гэллапом тест с меткой: на участок тела, находящийся вне поля зрения субъекта, наносят метку, а затем сравнивают поведение в тесте (с зеркалом) и в контроле (без зеркала). Для проверки данных о том, что высокоорганизованные птицы могут узнавать свое отражение, мы провели тест с меткой на 4 серых воронах, которые перед этим 6 месяцев жили в вольере, где было установлено зеркало. В каждой экспериментальной сессии одновременно участвовали две вороны, помещенные в две смежные клетки. В контрольных сессиях обе клетки были без зеркала, в тестовых – одна из клеток была с зеркалом. Провели 4 контрольных и 4 тестовых сессии (по 15 мин

каждая). Перед каждой сессией на опухало отдельного пера на лбу одной из ворон наклеивали метку из золотистой пленки (весом 5 мг). При анализе видеозаписей подсчитывали время, потраченное вороной на чистку зоны нанесения метки и на чистку остальных частей тела, а затем сравнивали эти показатели в тестовых и контрольных сессиях. Три вороны чистили зону нанесения метки в присутствии зеркала (в тестовых сессиях) достоверно чаще, чем без него (в контрольных сессиях), причем у одной из птиц различия были высоко достоверны ($p=0.0002$, точный тест Фишера). Эти данные подтверждают способность врановых птиц узнавать свое отражение в зеркале.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01160\16, тема 11-3-01.

Анализ связи полиморфизмов генов биологических часов с хронотипом и аварийностью у водителей, работающих посменно

Таранов Антон Олегович

Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН,

Россия, Москва

psy.msu.ru@gmail.com

Показано, что частота возникновения аварий имеет отчетливый циркадианный ритм. В силу индивидуальных различий функционирования внутренних биологических часов человек может быть хуже или лучше приспособлен к рабочему расписанию и недостаток сна может быть выражен в разной степени. Целью работы являлось исследование ряда генов биологических часов и их связи с хронотипом и аварийностью у водителей автобусов.

Исследована выборка профессиональных водителей (300 мужчин, средний возраст 46 лет). Режим работы водителей на автобазе состоял из 6 смен со скользящим графиком, начало смен: 3:30, 6:30, 9:30, 12:30, 15:30, 17:30. В группе были проанализированы данные о ДТП за 12 лет, данные о хронотипе по Мюнхенскому опроснику определения хронотипа (MCTQ) и Опроснику для самооценки индивидуальных особенностей цикла сон-бодрствование (SWPAQ), а также данные о однонуклеотидных полиморфизмах генов, связанных с биологическими часами человека.

Статистический анализ показал достоверные корреляции полиморфизмов генов, влияющих на циркадный ритм человека, с хронотипом и показателями аварийности. В частности: минорный аллель гена *CLOCK* (rs12649507) коррелирует с ранним хронотипом и таким показателем как «виновность в ДТП». Минорный полиморфизм *NPAS2* (rs4851377) коррелирует с высокой частотой попадания в ДТП не по своей вине. Минорный аллель *NPSR1* (rs324981) прямо коррелирует и с ранним хронотипом и с высокой частотой ДТП по своей вине, а также имеет обратную корреляцию с частотой ДТП, возникшим не по своей вине.

Можно предположить, что часовые гены могут влиять на аварийность опосредованно через хронотип: более ранний хронотип не способен поддерживать должный уровень внимания в поздние смены, и наоборот. Полученные результаты показывают важность учета индивидуальных особенностей, в частности генотипа и хронотипа, при формировании расписания посменной работы. Это особенно важно для снижения риска и оптимизации качества работы водителей пассажирского транспорта.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ № 14-06-00963 а.

Влияние отрицательных эмоций на пространственную картину ЭЭГ-активности у студентов

Трапезникова Е.А.

*ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Россия, Самара
ekat.trapeznikova2992@yandex.ru*

Актуальной проблемой физиологии человека является анализ функционального состояния организма студентов, испытывающих регулярный информационный стресс. Неуклонный рост интенсивности умственного труда вызывает у современных студентов эмоциональное выгорание, что отражается на биоэлектрической активности головного мозга. Цель нашей работы заключалась в анализе пространственного распределения ритмов ЭЭГ у студентов на фоне моделирования негативных эмоций.

Регистрацию ЭЭГ у испытуемых проводили с помощью нейровизора NVX36 digital DC EEG в стандартных отведениях согласно международной схеме «10-20» до и после эмоциогенных воздействий. Эмоции вызывали путём предъявления на дисплее компьютера изображений, отражающих состояния страха, горя, тревоги и гнева.

В состоянии спокойного бодрствования характерной особенностью ЭЭГ большинства студентов было сочетание альфа- и бета-ритмов в лобных, височных и центральных отведениях и наличие бета-ритма в затылочных отведениях. При эмоциогенной стимуляции картина ЭЭГ менялась, что в первую очередь выражалось ослаблением альфа- и усилением бета-активности в лобной и височной долях. В количественном выражении этот эффект особенно заметным был на фоне эмоций страха и горя. Что касается эмоций тревоги и гнева, то они вызывали более существенные изменения структуры ЭЭГ, причём качественного характера. При моделировании тревоги отмечалось исчезновение альфа- и появление тета-волн в лобных отведениях, а эмоция гнева сопровождалась угнетением альфа- и формированием дельта-активности в лобных и височных отведениях. Параметры бета-ритма под влиянием этих двух эмоций не менялись. Именно при тревоге и гневе у студентов происходила отчётливая смена типов ЭЭГ-активности, а именно, характерный для покоя I тип ЭЭГ заменялся на III тип.

Таким образом, отрицательные эмоции вызывают у студентов выраженные изменения пространственной картины ЭЭГ, характер которой определяется содержанием переживаемого эмоционального состояния. Появление медленноволновой ЭЭГ-активности на фоне тревоги и гнева может свидетельствовать о более выраженных, чем при других отрицательных эмоциях, сдвигах функционального состояния коры мозга и подкорковых эмоциогенных зон. Среди последних особого внимания заслуживают базолатеральное и центральное ядра миндалины, играющие важную роль в возникновении отрицательных эмоций.

Величина латентного периода саккад и антисаккад в экспериментальной схеме «go/no go delay» у человека

Федотова Анна Алексеевна, Чурикова Марина Александровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

fedotova.anna.2012@post.bio.msu.ru, m.a.churikova@gmail.com

Саккадические движения глаз служат информативной моделью для исследования процессов зрительного внимания и восприятия, а также когнитивного контроля двигательного поведения человека.

Для изучения мозговых механизмов процессов внимания и произвольного торможения при программировании саккадических ответов применяли экспериментальную схему «Go/no go delay» на 10 здоровых испытуемых-правшах. На каждом испытуемом проводили 2 эксперимента с ответами на «Go» стимул в виде саккады или антисаккады, которые регистрировали с помощью электроокулографии.

Установлено увеличение латентного периода (ЛП) антисаккады по сравнению с саккадой на 35 ± 3 мс, $p < 0.05$. Латеральных различий в величине ЛП саккад и антисаккад не выявлено. Зарегистрированы ошибочные ответы на тормозные стимулы («No go») в саккадической (12%) и антисаккадической (15%) схемах ($p < 0.05$), при этом ЛП ошибочного ответа был меньше, чем правильного, в обоих условиях эксперимента (на 94 мс для саккад и на 151 мс для антисаккад). Однако для ЛП ошибочных саккад показана противоположная пространственная асимметрия: ЛП ответов влево (для антисаккадической схемы) и вправо (для саккадической схемы) меньше по сравнению с ответами противоположного направления.

Увеличение ЛП ответа в виде антисаккады отражает бóльшую сложность программирования антисаккады, которая включает дополнительную нагрузку на пространственное внимание, а также торможение произвольной саккады на зрительный стимул. Противоположная латерализация ЛП ошибочных ответов в обоих условиях эксперимента может отражать различия в их природе: доминирование ведущего (левого) полушария при программировании саккады вправо и правого полушария, ведущего в процессах внимания и торможения, при программировании антисаккады влево. Уменьшение ЛП саккад и антисаккад вправо могут быть обусловлены спецификой «Go/no go delay» парадигмы. Введение межстимульного интервала (delay period) длительностью 2-3 секунды может значительно усиливать процессы опережающей готовности, включающей моторное внимание и прогнозирование, в обеспечении которых доминирует левое полушарие.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда Фундаментальных Исследований (проект № 14-04-01634 и № 16-04- 01079).

Изучение пространственных паттернов перинейрональных сетей на клеточной поверхности нейронов соматосенсорной коры

**Шайхутдинов Н.М.¹, Арст Н.И.¹, Кузнецова С.¹, Липачев Н.¹,
Мельникова А.А.¹, Мавликеев М.О.¹, Балтина Т.В.¹, Осин Ю.Н.¹, Киясов А.П.¹,
Раувала Х.²**

¹*Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, Казань*

²*Хельсинский университет, Финляндия, Хельсинки*

nurislam.schaihutdinov@yandex.ru

Перинейрональные (ПН) сети формируются на нейрональной поверхности в течении раннего постнатального развития, как важный функциональный элемент взросления синаптических цепей; они окружают ГАМКергические и глутаматергические синапсы на клеточной поверхности нейронов в центральной нервной системе (ЦНС), имеют нейропротекторное действие на животных в модели болезни Альцгеймера и регулируют синаптическую пластичность в процессах развития и регенерации. В последнее время значительно больше стало известно о физиологической значимости ПН сетей и их молекулярном строении, но микроструктура сети остается в значительной степени неизученной и на данный момент представляется однородной.

В настоящей работе использованы методы гистологии, флуоресцентной микроскопии и количественный анализ изображений с помощью программного обеспечения ImageJ для изучения микроструктуры ПН сетей нейронов из IV и VI слоя соматосенсорной коры во взрослых мышях и крысах.

подавляющее большинство ячеек ПН сети имеют четырехугольную, пятиугольную или шестиугольную форму со средней площадью ячейки $1,33 \text{ мкм}^2$ у мышей и $1,48 \text{ мкм}^2$ у крыс. В настоящей работе охарактеризованы два различных пространственных паттерна распределения хондроитин сульфатов в ячейке - с равномерным (неполярным) и неравномерным (полярным) распределением эпитопа, связывающего агглютинин *Wisteria floribunda* (WFA). Равномерная структура преобладает на телах клеток, в то время как неравномерная структура встречается чаще на проксимальных дендритах. ПН сети на поверхности тел нейронов образуют кластеры, состоящие из ячеек определенной морфологии. Результаты настоящей работы позволяют сделать предположения о роли ультраструктуры ПН сетей в регуляции синаптической передачи и пластичности. Возможно также образование паттернов ПН сетей обеспечивает дополнительный механизм для компартиментализации клеточной поверхности и обеспечивает формирование синапсов в группы в зависимости от пространственного паттерна

Параметры просаккад и антисаккад как потенциальные маркеры тревожных расстройств

Шалагинова Ирина Геннадьевна

*Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта,
химико-биологический институт, Россия, Калининград
shalaginova_i@mail.ru*

Дефицит внимания и нарушения саккадической активности - одни из когнитивных маркеров таких психических заболеваний как шизофрения, аффективные расстройства, синдром дефицита внимания и гиперактивности. Перспективной задачей является выявление специфических профилей глазодвигательных реакций для различных

психопатологий, что позволит разработать диагностические системы, основанные на биологических маркерах. Тонус структур мозга, участвующих в генерации саккад контролируется ГАМК-эргической системой, активность которой нарушена при тревожных расстройствах. Это позволяет ожидать специфические отклонения в параметрах саккад при патологической тревоге.

В исследовании приняли участие 18 испытуемых. Группа контроля – 10 здоровых испытуемых; экспериментальная группа - 8 пациентов с диагностированными тревожными расстройствами. Для оценки глазодвигательных реакций использовали авторскую методику видеоокулографии.

В исследовании показано удлинение латентных периодов (ЛП) корректных антисаккад и зрительно-вызванных просаккад у пациентов с тревожными расстройствами, при этом эффективность решения задач (число ошибок) не отличается от нормы. Таким образом, полученные результаты поддерживают предположение об интактности основных нейрональных структур, отвечающих за генерацию просаккад и антисаккад при тревожных расстройствах. Однако, удлинение ЛП саккад у пациентов с патологической тревогой по сравнению с нормой, позволяет предположить, что высокая эффективность решения задачи достигается за счет снижения оперативности.

Так же показано, что у испытуемых с патологической тревогой нарушена способность генерировать предиктивные саккады. Исследования на приматах и клинические данные показывают, что наиболее значимыми областями коры, вовлеченными в генерацию предиктивных саккад, являются фронтальные и дополнительные глазные поля, а также базальные ганглии. В нейровизуализационных исследованиях у пациентов с патологической тревогой обнаружено снижение активности сети базальные ганглии - фронтальная кора, что, по-видимому, и влияет на способность генерировать предиктивные саккады.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности использовать параметры саккадической активности как маркеры тревожных расстройств. Кроме того, специфические нарушения движений глаз могут предоставить важную информацию для понимания патофизиологии данных расстройств.

Применение метода айтрекинга для оценки глазодвигательных и когнитивных функций у пациентов с медуллобластомой

Шурупова Марина Алексеевна^{1,2}

¹*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва*

²*ЛРНЦ "Русское поле" ФГБУ "ФНКЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева"*

Минздрава России, Чехов

shurupova.marina.msu@gmail.com

Известно, что структуры мозжечка вовлечены в управление глазодвигательной системой. Медуллобластома – опухоль задней черепной ямки – поражает ряд долек полушарий и червя мозжечка. У таких пациентов возникает спектр глазодвигательных и связанных с ними когнитивных нарушений. Для оценки таких нарушений и их динамики в процессе реабилитации пациентов нами были дополнены и адаптированы ряд парадигм.

В пилотном исследовании принимали участие 3 пациента (1 мужчина, 2 женщины, 13-17 лет). У всех пациентов была диагностирована медуллобластома на разной стадии (1 - M0, 1 - M1, 1 - M2). Исследование состояло из двух экспериментальных сессий,

проводившихся в период первой и второй госпитализации. Сессия состояла из 4 тестов, включающих в себя качественную и количественную оценку: тест удержания взора, тест на зрительно-вызванные саккады, тест по оценке стратегии сканирования пространства и рабочей памяти (т.н. «10 точек»), тест на ритмические саккадические паттерны (т.н. «забор»). Движения глаз регистрировали с помощью айтрекера Arrington 30/60 Hz.

Тест на удержание взора выявил статистически достоверное увеличение стабильности удержание взора у всех пациентов во второй сессии, выражавшееся в уменьшении числа интрузивных саккад. В тесте на зрительно-вызванные саккады у одного пациента статистически достоверно возросла точность саккад. У двух пациентов тест «10 точек» выявил статистически значимое улучшение таких параметров как время выполнения и число фиксации. Наконец, у одного пациента во второй сессии было выявлено правильное выполнение теста «забор».

Мы применили в клинической практике ряд качественных и количественных парадигм и выявили улучшение глазодвигательных и когнитивных функций в результате прохождения пациентами процесса реабилитации. В дальнейшем мы планируем увеличить число пациентов для верификации успешности применения таких диагностических тестов. Также с целью коррекции постоперационных глазодвигательных и связанных с ними когнитивных нарушений с использованием метода биологической обратной связи будут разработаны специальные парадигмы для компенсации этих нарушений.

**Диссоциация механизмов памяти об опасной обстановке
при разной интенсивности подкрепления**

Щербакова Мария Сергеевна

НИЦ «Курчатовский Институт», Россия, Москва

masha-schr@ya.ru

Исследование особенностей молекулярно-клеточных и системных механизмов, лежащих в основе сильной стрессорной памяти, в настоящее время является актуальной задачей нейробиологии. Большое распространение получили исследования посттравматических стрессовых расстройств на лабораторных животных в моделях с нанесением электрокожного раздражения. Было показано, что силу аверсивной памяти при обучении в модели условно-рефлекторного замирания (УРЗ) определяет интенсивность безусловного стимула, а также выявлен эффект влияния интенсивности безусловного стимула на реконсолидацию памяти. Имеющиеся в литературе данные предполагают существование различий в молекулярно-биологических механизмах долговременной памяти, лежащих в основе слабой и сильной версий стрессорного опыта. Целью работы было выявить в слабой и сильной версии обучения УРЗ на обстановку различия в эффектах блокады синтеза белка при реактивации памяти и различия в уровне экспрессии транскрипционного фактора *c-Fos* в латеральной и базолатеральной миндалине, зубчатой фасции и фронтальной коре мозга мышей. В работе показано, что в тесте через 24 ч после обучения в слабой версии УРЗ (0,5 мА, 2 сек, 3 раза, интервал 1 мин) на обстановку уровень замирания у мышей не отличался по сравнению с сильной версией УРЗ (1 мА, 2 сек, 3 раза, интервал 1 мин). После напоминания обстановкой через 3 дня после обучения в слабой и сильной версии УРЗ уровень замирания у мышей оставался высоким и также не отличался. Введение циклогексимида (100 мг/кг) за 1 ч до

напоминания (через 3 дня после обучения) в слабой, но не в сильной версии УРЗ, нарушало долговременную память в тесте через 3 дня. Обучение в слабой версии УРЗ индуцировало повышение экспрессии c-Fos в латеральной миндалине и в зубчатой фасции гиппокампа по сравнению с несочетанным предъявлением слабого тока. Обучение в сильной версии УРЗ индуцировало повышение экспрессии c-Fos в латеральной миндалине и во фронтальной коре по сравнению с несочетанным предъявлением сильного тока. В группе сильного стресса уровень экспрессии c-Fos в базолатеральной миндалине был выше, чем в группе обучения в сильной версии УРЗ. Обучение в сильной версии УРЗ приводило к повышению уровня экспрессии c-Fos в латеральной миндалине и во фронтальной коре по сравнению с группой обучения в слабой версии УРЗ, но не в базолатеральной миндалине и зубчатой фасции гиппокампа. Системные и молекулярные механизмы, обеспечивающие различия слабой и сильной стрессорной долговременной памяти, требуют дальнейших исследований. Работа выполнена в соответствии с планом НИЦ «Курчатовский институт» (ГЗ 2015 г., п.1.2) на оборудовании РЦ НКИ.

ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Экологическая оценка потоков парниковых газов (CH₄, CO₂, N₂O) в ельниках Центрально - Лесного Заповедника

Алилов Д.Р.

РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

Daniyal0593@mail.ru

Одной из основных проблем современной экологии является глобальные изменения климата и биоты. Проблемы изменения климата связывают с возрастающей эмиссией парниковых газов. Важную роль в регулировании потоков парниковых газов играют почвы, ответственные за 60-80% эмиссии CO₂ наземных экосистем.

Были проведены комплексные почвенно-экологических исследования с оценкой пространственно-временной изменчивости почвенных потоков парниковых газов в представительных для южнотаежных экосистем Европейской части России вариантов ельников Центрально-Лесного заповедника (Нелидовский район Тверской области). Основные объекты исследований - ельник сфагново-черничный, ельник неморальный кислично-щитовниковый и ельник кислично-разнотравный старше 300 лет с дерново-слабоподзолистыми почвами.

Мониторинговые измерения потоков парниковых газов осуществляются подекадно методом высокочастотных измерений *in situ* в напочвенных экспозиционных камерах, с сопутствующими измерениями влажности почвы, ее температуры, температуры воздуха и атмосферного давления. Также раз в 10 дней производится отбор проб воздуха в виалы (небольшие стеклянные или полипропиленовые пузырьки) с последующим их анализом на газовом хроматографе (определение концентрации CO₂, CH₄, N₂O). Исследование почвенных образцов включает определение в них содержание гумуса (метод И.В. Тюрина), рН водный, содержание подвижных форм фосфора и калия, плотность сложения (весовой метод).

В ходе многолетних исследований удалось установить, что доля почвенного дыхания в разные годы составляет от 20 до 67% от всего дыхания экосистемы. Среди всех 7 лесных экосистем, включенных в сеть *FluxNet*, только ельник сфагново-черничный Центрально-Лесного заповедника является источником CO₂ для атмосферы (т.е. выделение CO₂ при дыхании преобладает над поглощением при фотосинтезе).

Интенсивность почвенной эмиссии парниковых газов определяют: возраст, породный состав древостоя, характер напочвенного растительного покрова, мезорельеф и микрорельеф, влажность и температура почвы.

Моллюск *Lymnaea stagnalis* L. 1758 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) как тест - объект для оценки эндокринных нарушений у гидробионтов

Антонова Валерия Юрьевна

Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Россия, Калининград

ValeriiaAntonova@yandex.ru

Появляется все больше сведений о наличии в водной среде веществ, вызывающих нарушения в эндокринной системе гидробионтов. Тест-объекты, используемые для изучения таких нарушений, должны иметь хорошо сформированную эндокринную систему, обеспечивающую их чувствительность к гормональным факторам, а

фенотипические изменения - отражать характер воздействия фактора. Среди беспозвоночных гидробионтов наиболее развитой и хорошо изученной эндокринной системой обладают ракообразные и моллюски.

Цель работы — изучить особенности воздействия экзогенно вводимого стероидного гормона гидрокортизона на динамику нереста, ход эмбриогенеза и некоторые особенности постэмбрионального развития прудовика *Lymnaea stagnalis*, который использовался в качестве модельного объекта.

В экспериментах использовали одноразмерных особей с высотой раковины 40 мм. Изучали действие раствора стандарта гидрокортизона (Sigma — Aldrich, США). Препараты вводили внутримышечно - в ткань ноги. Рабочая концентрация и доза вводимого гормона соответствовали физиологической.

Гидрокортизон сократил диапазон сроков нереста, изменил характер нерестовой активности. Отмечено снижение плодовитости моллюсков, сопровождавшееся выраженным увеличением размеров кладки, что связано, вероятно, со стимуляцией гормоном придаточной железы.

Период эмбриогенеза у инъекцированных моллюсков завершался на 10 часов раньше, чем в контроле. В максимальной степени стимулирующий эффект гидрокортизона проявился на стадиях гастролы и великонха.

На этапе постэмбриогенеза гидрокортизон сокращал сроки вылупления молоди и менял динамику этого процесса. Гормон заметно угнетал ростовые процессы, причем его действие усиливалось во времени.

Наличие у прудовиков комплекса выраженных ответных реакций на введение экзогенного гидрокортизона свидетельствует о высокой гормоночувствительности этого вида. Изменения характера эмбриогенеза, репродуктивной и нерестовой активностей, линейного роста отражают характер и степень воздействия препарата на выбранные тест-функции. Можно предположить, что попадание гормона приводит к нарушению гормонального гомеостаза, и, как следствие, нарушению нормальной реализации основных функций организма. Все это позволяет предложить *Lymnaea stagnalis* в качестве тест-объекта для оценки эндокринных нарушений у гидробионтов.

Биологическая индикация экологического состояния почв южного побережья Крыма

Безус Евгения Игоревна, Муругина Виктория Сергеевна

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии

имени Д.И. Ивановского, Россия, Ростов-на-Дону

bezus.finik@yandex.ru

Ферментативная активность почв является важным показателем экологического состояния ландшафтов. По активности ферментов можно определить плодородие и влияние на почву разных антропогенных факторов, в том числе химического загрязнения, переувлажнения, засоления. Наиболее распространенными почвами крымских гор являются бурые лесные почвы (буроземы). Кроме того, на южных склонах Крымских гор распространены коричневые почвы, обычно каменистые и маломощные. Оба этих типа почв были объектами настоящих исследований.

Цель исследований - исследование применимости активности внеклеточной каталазы в биодиагностике экологического состояния почв. Полевые исследования на

территории черноморского побережья Крыма были проведены в ноябре 2015 года. Для исследования почв был заложен ряд полнопрофильных разрезов и прикопок от поселка Никита до Севастополя. В качестве биологического индикатора была исследована активность каталазы газометрическим методом по А.Ш. Галстяну без добавления мела. Исследования проводили в 3-9-кратной повторности. Каталаза – один из наиболее исследованных ферментов, активность которого в почвах может служить диагностическим показателем. Функция каталазы сводится к разрушению токсичного пероксида водорода, образующегося в ходе различных окислительных процессов в организме.

Проведенные исследования показали значительное различие значений активности каталазы в разных почвах Крыма и, даже, в почвах одного типа. Различия касаются не только поверхностных горизонтов почв, но и их профильного распределения. Низкая активность каталазы выявлена в кислом буроземе с явными признаками проявления подзолистого процесса, который приводит к кислотному разрушению почвенных минералов. Даже поверхностный маломощный горизонт этой почвы обладает средней активностью исследуемого фермента. В исследуемых коричневых почвах выявлено значительное различие для почв одного типа. В зависимости от степени карбонатности, характера растительности и степени антропогенного преобразования эти почвы значительно изменяются по уровню ферментативной активности. Большая часть образцов этих почв обладает высокой и очень высокой активностью исследуемого фермента. Однако какой либо одной закономерности распределения активности каталазы не было обнаружено. Для разных разрезов отмечены и инверсии активности внутри почвенного профиля. Использование коричневых почв под виноградниками приводит к значительным изменениям активности каталазы. В природной почве под лесом выявлена значительно более высокая активность каталазы (в 1,5-5 раз) по сравнению с антропогенно-нарушенными почвами того же типа. Причинами этого явления являются снижение общей биогенности, содержания гумуса питательных элементов сельскохозяйственных почв.

В результате исследований установлена возможность использования ферментативной активности в качестве биоиндикатора экологического состояния почв Крыма.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (6.345.2014/К) и государственной поддержке ведущей научной школы Российской Федерации (НШ-2449.2014.4).

Химический состав эмбрионов мелких млекопитающих, как индикатор степени техногенного воздействия предприятия на окружающую среду

Беляновская А. И.

*Томский политехнический университет, Россия, Томск
toobiovet@mail.ru*

Репродуктивная система является биологическим индикатором экологического состояния окружающей среды, на формирование нового организма оказывают влияние множество различных факторов, в том числе степень загрязненности окружающей среды.

В работе использованы материалы, полученные сотрудниками Института экологии растений и животных УрО РАН при изучении мелких млекопитающих в зоне действия

крупного медеплавильного комбината (г. Ревда, Средний Урал) при участии автора. На основании анализа содержания тяжелых металлов в природных средах были выделены фоновые (20–30 км), и импактные (1–2 км) участки. Модельный объект - рыжая полевка (*Clethrionomys glareolus*, Schreber, 1780).

Для анализа проб использовался метод инструментального нейтронно-активационного анализа, аналитик – с.н.с. Судыко А.Ф.

При сравнении содержания химических элементов в эмбрионах рыжей полевки на территории импактной и фоновой зоны наблюдается следующее:

1. На участке, удаленном от предприятия на расстояние 1-2 км (импактная зона) такие химические элементы, как Fe, Zn, Cr, La, Ce концентрируются в большей степени, нежели на участках, удаленных на расстояние в 20-30 км. Fe, Zn, Cr, являются типичными металлами-загрязнителями, исходящими от предприятий цветной промышленности, их содержание в пробах отобранных на импактной и фоновой зоне изменяется для Fe от 1396 ± 75 до 292 ± 50 мг/кг, Zn 114 ± 5 до 86 ± 7 мг/кг, Cr $2 \pm 0,4$ $0,6 \pm 0,06$ мг/кг соответственно. La и Ce относятся к редкоземельным элементам (РЗЭ), которые содержатся в пламени и дымах промышленных выбросов. РЗЭ могут поступать в живые организмы с питьевой водой, с атмосферной пылью, содержание меняется от $0,2 \pm 0,02$ $0,9 \pm 0,01$ мг/кг для La, и для Ce от $0,6 \pm 0,3$ до $0,1 \pm 0,02$ мг/кг.

2. Эмбрионы, отобранные на более удаленных от предприятия участках (20-30 км) накапливают большее количество Na, чем близкие к заводу участки, его концентрация варьируется от 15120 ± 785 мг/кг в импактной зоне, до 17313 ± 807 на контрольной.

Эмбрионы, отобранные на участках близкорасположенных к источнику загрязнения окружающей среды (1-2 км) концентрируют в себе большее количество элементов-загрязнителей предприятий цветной металлургии, чем отобранные на удаленных участках (20-30 км). Предполагается, что привнос вышеупомянутых элементов в эмбрионы происходит из-за нарушения работы плацентарного барьера, причиной которого является усиление техногенного воздействия.

Для эмбрионов, отобранных на территории контрольной зоны (20-30 км) характерно накопление макроэлемента – Na, это, возможно, связано его высокой биологической ролью в процессе онтогенеза.

Оценка общего жизненного состояния сосны и ели в условиях города Махачкалы

Гаджикурбанов Рабазан Халинбекович

*Дагестанский государственный педагогический университет, Россия, Махачкала
mushammad@mail.ru*

Отрицательное воздействие на окружающую среду в городе оказывают многие факторы: транспорт, промышленное и сельскохозяйственное производство, трансграничный перенос поллютантов и т.п. Основными загрязняющими веществами, выбрасываемыми в атмосферный воздух города Махачкалы, являются: диоксид серы, сероводород, диоксид азота, оксид углерода. Исследовали воздействие загрязнений на состояние хвойных деревьев, произрастающих на улицах г.Махачкалы с различной транспортной нагрузкой.

Исследования проведены по общепринятой методике. Объектами исследования являлись сосна крючковатая (Коха), сосна обыкновенная, ель обыкновенная. Основными

параметрами оценки общего жизненного состояния (ОЖС) выбраны следующие морфологические показатели: степень дефолиации кроны, пожелтения хвои, количество старых и новых шишек, прирост побегов, тип дефолиации и формы кроны.

Были выбраны три пробные площадки (ПП), располагающиеся на большом расстоянии друг от друга и отличающиеся между собой разной антропогенной нагрузкой. Выявлено, что ОЖС наиболее худшее на ПП1 и ПП2. При этом у сосны обыкновенной более выражены признаки дефолиации и хлороза, чем у других исследуемых объектов.

То, что деревья на всех трех площадках ослаблены, говорит о том, что атмосферный воздух в районе исследования загрязненный. Ослабление состояния деревьев связано с близким расположением пробных площадок ПП1 и ПП2 к улицам с высокой транспортной нагрузкой, что приводит к ослаблению состояния деревьев, снижению срока жизни хвои и появлению точечных и апикальных некрозов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что на состояние деревьев большое влияние оказывает увеличение автотранспортного движения. Основную массу составляет одно- и двухлетняя хвоя, при этом на ПП1 и ПП2 отмечен большой процент потери хвои третьего года жизни. На ПП1 наблюдается выраженная дефолиация и пожелтение хвои. Выявлено, что сосна обыкновенная более чувствительна к техногенным факторам среды.

Биологические и гидрофизические исследования для разработки системы интерактивного мониторинга водоёмов озёрного типа

Гусейнова Саяд Мухтаровна

*Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет,
Россия, Нижний Новгород
guseinova.sayad2011@yandex.ru*

Одной из актуальных современных экологических задач является разработка практически применимых способов прогнозирования процесса массового развития цианобактерий, пагубно влияющего на водные экосистемы. Целью данной работы является разработка системы интерактивного мониторинга водоёмов, позволяющей оценивать и прогнозировать процессы цветения по измеряемым параметрам прозрачности и температурной стратификации.

Материалы исследования – пробы воды, отобранные на разной глубине в течение 4-х месяцев на Горьковском водохранилище в Нижегородской области. Измерение температуры воды проводилось с помощью STD – зонда. Получение качественных показателей заключалось в идентификации обнаруженных водорослей, количественных – в подсчёте концентрации хлорофилла (по формуле Оливье Бернара) в зависимости от температуры и прозрачности, измеренной диском Секки.

По измеренным гидрофизическим показателям были построены профили изменения температуры воды в водоёме с глубиной. По результатам гидрофизических исследований сделан вывод о том, что вследствие прогрева воды в первой половине лета в водохранилище наблюдается устойчивое расслоение. В тёплые месяцы в пробах воды из водохранилища были обнаружены многочисленные экземпляры диатомовых, сине-зелёных и зелёных водорослей. В прохладные месяцы в пробах обнаружены лишь представители *Melosira varians* и *Melosira italica* в приповерхностных слоях. Из видов, вызывающих «цветение» воды, в пробах также были обнаружены представители зелёных

водорослей (*Scenedesmus quadricauda* и др.) и особо токсичные сине-зелёные водоросли (*Anabaena flos-aquae* и др.). Был произведён подсчёт концентрации хлорофилла для обнаруженных водорослей и построены графики изменения его значений с глубиной.

Установлено, что в разных слоях водной толщи доминируют определённые виды водорослей, занимая, таким образом, собственную нишу, что является признаком влияния на распространение водорослей в водной толще устойчивой температурной стратификации. Экспериментально установлена зависимость прозрачности воды от температуры верхнего перемешанного слоя, которая в свою очередь определяет значение концентрации хлорофилла. Следовательно, измеряя прозрачность и температуру воды, на основе подсчёта концентрации хлорофилла можно в режиме реального времени делать выводы о наблюдаемой и прогнозируемой концентрации цианобактерий.

Оценка влияния адаптации мух *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) на приспособленность при чередовании неблагоприятного и стандартного кормовых субстратов

Дмитриева Анастасия Сергеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

dmnasty89@mail.ru

Цель исследования заключалась в экспериментальной проверке влияния на приспособленность потомков лабораторных популяций *D. melanogaster* при существовании на различных попеременно чередующихся кормовых субстратах. Для этого проводился анализ изменения приспособленности популяций *D. melanogaster* к кормовым субстратам с различным содержанием поваренной соли в ходе эволюционного эксперимента.

Для обеспечения постановки опыта в течение 20 поколений поддерживались девять различных популяций *D. melanogaster* на стандартизированном и содержащем 2% и 4% NaCl лабораторных кормах. Затем мухи рассаживались в стандартные пробирки для последующего анализа численности и динамики размножения, а также производилось взвешивание мух. Статистический анализ данных проводился с помощью программ Statistica 10 и Excel 2007. Для получения дополнительных данных по бактериальной микробиоте использовались методы метагеномного анализа.

В ходе работы были получены следующие результаты:

Присутствие соли в корме в любой степени подавляет развитие мух всех линий, пропорционально содержанию соли. Линия мух, в течение 20 поколений, содержащихся на кормовой среде с 4% NaCl, в итоге показала вдвое более высокую эффективность размножения на этом субстрате по сравнению с остальными линиями. У линий, выращиваемых на кормах с добавлением соли задержка развития уменьшилась по сравнению с контрольной линией, живущей на нормальном корме. По массе тела имаго, различий между линиями не выявлено. Линии, адаптированные к среде с 2% и 4% NaCl, продемонстрировали повышенную по сравнению с контролем эффективность размножения на благоприятном кормовом субстрате. Кроме того, у линии, выращенной на корме с 4% NaCl отмечено более быстрое развитие на слабо стрессовой среде с 2% NaCl по сравнению с линией, неадаптированной к соли.

Эволюционный эксперимент по исследованию лабораторных популяций *D. melanogaster* за 11 месяцев показал успешную адаптацию мух к неблагоприятному

кормовому субстрату, что проявилось в повышенном суммарном количестве потомков и более быстрой динамикой развития особей из адаптированных линий. Повышение приспособленности адаптированных линий также к благоприятным субстратам показывает тенденцию к расширению трофической ниши и росту экологической толерантности данных особей. Негативные побочные эффекты адаптации к среде с повышенным содержанием соли не были выявлены. Некоторые факторы, влияющие на вероятность повышения приспособленности без заметных отрицательных эффектов могут быть связаны с параллельной адаптацией симбиотической микробиоты *D.melanogaster*, которая наследуется потомками от родителей.

Автор благодарен А.В.Маркову, С.Б. Ивницкому, И.А. Максимовой, М.Д. Логачёвой, В.А. Скобеевой за неоценимую помощь в постановке эксперимента и плодотворное обсуждение результатов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 14–14–00330.

Определение селективных концентраций полиэтиленгликоля для разработки технологии получения растений полевицы тонкой, устойчивых к засухе

Евсюков Сергей Викторович, Гладков Е.А.

ИФР РАН, Россия, Москва

evsyukov_2013@mail.ru

Засуха — один из основных неблагоприятных экологических факторов в городских экосистемах, которая существенно ограничивает распространение растений. Объект исследования газонная трава — полевица тонкая (*Agrostis capillaris* L., 1753). Преимущество полевицы тонкой — малая требовательность к плодородию почв и морозоустойчивость. Однако полевица тонкая чувствительна к засухе. Среди способов решения данной проблемы — использование клеточной селекции, которая применяется для получения растений, устойчивых к различным неблагоприятным экологическим факторам.

Цель работы: получение растений полевицы тонкой, устойчивых к засухе.

Ранее была разработана технология получения каллуса и регенерации растений полевицы тонкой. Каллус был получен на модифицированной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Для оценки влияния осмотического стресса, полученные каллусы пересаживали на жидкую питательную среду МС, содержащую полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000) 10, 15 и 20%, в качестве осмотического агента. Культивирование каллусов на селективной среде проводилось в течение двух пассажей (по 30 суток). При концентрации 10% ПЭГ все каллусы обладали близкой к 100% (по сравнению с каллусами, культивируемыми на жидкой среде МС без ПЭГ) морфогенной способностью. При содержании 20% ПЭГ морфогенную способность сохраняла менее 10% каллусов. При концентрации 15% ПЭГ в питательной среде часть каллусов сохраняли способность к морфогенезу и из них удалось получить регенеранты, поэтому данная концентрация была выбрана в качестве селективной. Затем морфогенные каллусы, полученные на среде с ПЭГ, пересаживались на среду для регенерации МС в течение одного пассажа, затем пересаживали в пробирки на среду МС с половинным содержанием сахарозы и минеральных компонентов для укоренения.

Таким образом, для каллусов полевицы тонкой оценено влияние осмотического стресса. Определена селективная концентрация ПЭГ, получены растения полевицы

тонкой. Полученные результаты будут использованы в разработке схемы клеточной селекции для получения засухоустойчивых растений полевицы тонкой.

Мониторинг природных растительных сообществ в целях устойчивого природопользования с использованием аэрофотосъемки с БПЛА

Замятина Екатерина Олеговна, Фадеев Николай Борисович

МИИГАуК, Россия, Москва

katya.zamyatina@gmail.com

Усиление антропогенного воздействия на растительные сообщества создает угрозу для экосистем и требует создания адекватных методов наблюдения и контроля в целях устойчивого природопользования. Бесконтрольная заготовка лекарственных растений приводит в ряде регионов к сокращению численности или полному уничтожению. Предлагаемая методика использует новые средства аэрофотосъемки (АФС) для мониторинга растительных сообществ, в частности, дикорастущих лекарственных растений (ЛР).

В Тульской области проведены наземные полевые геоботанические и биометрические исследования лекарственных растений и выполнено несколько серий аэрофотосъемочных полетов различными БПЛА ("Геоскан 101", "Орлан 10", "Орлан 1", "Птеро СМ") с различной комплектацией бортового и аэрофотосъемочного оборудования. Аэросъемка одного и того же участка местности производилась с высот от 250 м до 1000 м, с дальнейшей обработкой аэрофотосъемочных материалов в ЦФС PhotoScan ("Agisoft") и РНОТОМОД ("Ракурс").

В ходе геоботанического обследования местности выявлены природные популяции ряда видов лекарственных растений: *Archangelica officinalis* Hoffm., *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop., *Galium verum* L., *Urtica dioica* L., оценены их площади и измерена биопродуктивность. Проведено сравнение данных, полученных наземными исследованиями и данных по изучаемым популяциям, полученных при фотограмметрической обработке и дешифрировании аэрофотоснимков с БПЛА (площадь популяций, число экземпляров, высота растений). Составлен ортофотоплан территории с результатами дешифрирования, полученными при съемке с БПЛА "Орлан 10" с камерой PhaseOne iXU с разрешением на местности 2,5 см. В результате проведенных исследований получены экспериментальные данные по аэрофотосъемке растительных сообществ ЛР, цифровые пространственные данные о запасах ЛР с учетом рельефа, что позволяет проводить экономическую оценку растительных ресурсов на конкретной территории. Создана методика картографирования, учета и мониторинга запасов лекарственных растений с использованием ДДЗЗ и ГИС-технологий.

Предлагаемая методика позволяет создавать геоботаническую карту, где в качестве картографической основы используются точные, актуальные, цифровые фотопланы, которые, в свою очередь, позволяют выполнять камеральное дешифрирование. Использование фотопланов в ГИС среде дает возможность создавать базы данных ЛР, которые содержат количественные и качественные характеристики растений. Созданная методика может стать частью технологии оценки природных ресурсов и прогнозирования состояния литосферы и биосферы в целях устойчивого природопользования.

Использование личинок мухи *Hermetia illucens* в животноводстве

Зеленченкова Алена Анатольевна

*ВНИИ животноводства имени ак.Л.К. Эрнста", Россия, Подольск
aly4383@mail.ru*

По оценкам ФАО, одним из основных и доступных источников питательной и богатой белками пищи являются насекомые. Так, скармливание личинок мухи львински чёрной *Hermetia Illucens* свиньям достаточно широко практикуется в зарубежных странах. Производство данного кормового компонента рассматривается с экологической точки зрения, как решение безотходного производства: утилизация навоза и переработка его в перегной со снижением содержания азота и фосфора и одновременным получением белкового корма. Одна особь может употреблять от 25 – 500 мг органики в сутки, но оптимальным является 100 мг/гол/сут. К преимуществам относится короткий цикл развития личинок – 20 суток или полный производственный цикл 432 часа (18 суток).

В условиях физиологического двора ВИЖ им. Л.К. Эрнста был проведен физиологический опыт на гибридном (F-1:КБхЛ) поголовье молодняка свиней в период доращивания. Во всех группах скармливался полнорационный стартовый комбикорм – СК-4. В 1-контрольную группу добавляли 5,0% рыбной муки (РМ), во 2-опытную 7,0% муки личинок мухи (ЛМ) на фуражном зерне, в 3-опытную 5,0% РМ, с включением БАД «Простор» с личинками (ЛМ) в дозе 0,5кг/т. Максимальный прирост у животных опытных групп был выше на 7 – 14 % по сравнению с аналогами контрольной группы. По затратам комбикорма на получение единицы продукции показатели в опытных группах были ниже относительно контрольной на 0,2 – 0,3 кг или на 8,0 – 12,0 % соответственно. Также затраты обменной энергии на 1 кг прироста были меньше на 0,5 и 2,19 МДж, или на 1,7 и 7,5%.

Проведенное исследование показало, что применение муки из личинок *Hermetia illucens* в перспективе можно рассматривать в качестве рациональной альтернативы традиционному корму (рыбной муке), удовлетворяющей потребности поросят в период доращивания. Вместе с тем целесообразно включать в рацион животных микродозу личинок в составе комплексного пробиотического препарата. Применение комбинации пробиотического препарата с заданными биологическими свойствами с БАВ личинок мухи *Hermetia illucens* обеспечит более высокие темпы роста и развития молодняка сельскохозяйственных животных, обеспечит повышение их сохранности, стрессоустойчивости и продуктивности.

Экологическая оценка почвенной эмиссии парниковых газов на участках разновременной залежи Центрально-Лесного заповедника

Комарова Татьяна Викторовна

*РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва
taniakomarova999@gmail.com*

Проблема глобального изменения климата, вызванная повышением концентрации парниковых газов (CO₂, CH₄ и N₂O) в атмосфере, является одной из ключевых современных экологических проблем. Одним из основных факторов, влияющих на изменение потока парниковых газов, является изменение режимов землепользования. Интересным объектом их исследования является Центрально-Лесной заповедник, где был выбран ряд сопоставимых между собой залежных участков.

Сезонные измерения и суточный ход потоков CO_2 *in situ* (на 5 участках разновременных залежей: от свежей залежи с травостоем до залежи, заросшей лесом возрастом старше 120 лет) проводились с помощью мобильного газоанализатора Li-820 методом напочвенных экспозиционных камер. Также подекадно проводился отбор проб почвенного воздуха в виалы для дальнейшего измерения потоков CO_2 , CH_4 и N_2O на газовом хроматографе.

В результате исследования установлено, что интенсивность почвенной эмиссии CO_2 уменьшается с увеличением возраста залежей почти в 2 раза (на залежи с травостоем почвенная эмиссия CO_2 достигала 34 – 35 $\text{гCO}_2/\text{м}^2$ день, а на залежи, заросшей лесом возрастом старше 120 лет - 17 – 18 $\text{гCO}_2/\text{м}^2$ день). Максимальные почвенные потоки CO_2 отмечались с 12:00 до 18:00 часов. Для залежи, заросшей лесом возрастом старше 120 лет характерно стабильное поглощение N_2O (до -0,6 $\text{мгN}_2\text{O}/\text{м}^2$ день). По абсолютным значениям почвенная эмиссия CH_4 (до 0,65 $\text{мгCH}_4/\text{м}^2$ день) и N_2O (0,2 $\text{мгN}_2\text{O}/\text{м}^2$ день) выше на залежи с травостоем.

Проведенные исследования выявили максимальную интенсивность почвенной эмиссии на залежи с травостоем, с постепенным ее снижением при зарастании залежи, что сочетается с повышенным содержанием гумуса и процессами его минерализации. При зарастании залежи отмечается быстрое нарастание растительной биомассы, сопровождаемое постепенным снижением содержания гумуса и интенсивности минерализующих процессов. Выявленные закономерности влияния температуры и влажности почвы позволяют прогнозировать их сезонные изменения, при моделировании которых, желательно, учитывать суточную динамику почвенных потоков.

Исследования проводились в рамках проектов Правительства РФ № 11.G34.31.0079 и 7 рамочной программы ЕС (№ 603542).

Оценка изменения характеристик снежного покрова города Омска за 2014-2016 годы

Кубасова Дарья Александровна

*Омский государственный технический университет, Россия, Омск
diindynia@gmail.com*

Омск – промышленный город. За последние несколько лет вклад передвижных источников в суммарные выбросы загрязняющих веществ в атмосферу увеличился с 55% до 65%. Снежный покров на прилегающих территориях поглощает и накапливает разнообразные загрязнения. Исследовали загрязнение снежного покрова г.Омска 2014-2016 гг., определяя в талой воде (снега) наличие нитратов, фосфатов, хлоридов, ионов аммония, жесткости.

В 2014 году рН у обочины на перекрестках составил 7,3-7,7, а на удалении от дороги 6,5, в 2016 году – 8,5 у обочины и 6,5 – на удалении. Снег имеет щелочную среду, и, скорее всего, сильно загрязнен автомобильными выхлопами. Нитрат ионы (NO_3) в пробах снега обнаружены на улицах пр. Мира на пересечении с ул. Нефтезаводская и ул. Химиков (1,25 и 0,364). Путь попадания в окружающую среду – автомобильные выхлопы и близлежащие ТЭЦ. Минимальное содержание нитратов отмечено у ДК им. Малунцева – 0,10 и на ул. Поселковая – 0,19. С 2014 по 2016 год показатели остаются прежними.

Максимальное содержание фосфат-ионов отмечено на пр. Мира (Кристалл – 1,07) и у ОмГТУ – 0,89. Минимальное содержание фосфатов отмечены по ул. Химиков и на пр. Мира (пересечение с Нефтезаводской) (0,04 и 0,07).

Наибольший показатель окисляемости отмечен на пр. Мира – 13,4 и по ул. Химиков – 10,5. Можно предположить, что данные участки подвержены сильному воздействию хозяйственной деятельности человека и содержат органические вещества. По мере удаления от дороги показатель окисляемости снижается, а на ул. Поселковая он минимален - 1,59. В 2016 году этот показатель значительно снизился 0,44-0,1.

Максимальный показатель минерализации (NaCl) отмечен на пр. Мира (Кристалл – 114,3) и у ДК им. Малунцева (481,2). Это связано с наличием перекрестков, и как следствие, применением хлористого натрия на дорогах в периоды борьбы с гололедом.

Хлориды – токсичные вещества, максимальная концентрация которых в снеге отмечена вдоль крупных автомагистралей: пр. Мира и ул. Химиков (от 837,8 до 1384,5). При удалении от дороги на 30-50 метров концентрация хлоридов уменьшается до 17,04. Во всех пробах снега отмечалось превышение ПДК ионов аммония. Максимальная концентрация у ОмГТУ и по ул. Химиков (от 1,15 до 1,51).

Индекс токсичности определяли по прорастанию семян гороха в талой воде. В пробах погибло от 80 до 100% семян гороха в 2014 г., и 99% в 2016 г., т.е. возросла токсичность снежного покрова.

Таким образом, наблюдается рост практически во всех исследуемых показателях. Это связано, прежде всего, с увеличением количества автомобильного транспорта на дорогах, работой промышленных предприятий, с отсутствием достаточного количества насаждений, способных аккумулировать некоторые виды загрязнений и воздействием хозяйственной деятельности человека.

Экологически безопасный способ обеззараживания сточных вод

Лимаренко Николай Владимирович

Донской государственный технический университет, Россия, Ростов-на-Дону

nikolajj-limarenko@rambler.ru

По данным ВОЗ, одним из основных и наиболее опасных источников загрязнения окружающей среды являются сточные воды. Наиболее серьёзную опасность представляют стоки птицеводческих и животноводческих ферм, обладающие патогенной микрофлорой. Применяемые способы обеззараживания не являются в достаточной мере экологически безопасными, почему актуальны попытки решения этой проблемы.

В ходе исследования использовались следующие методы: биоиндикации, биотестирования, регрессионный и корреляционный анализ, методы микроскопии, методы инструментального, прямого и косвенного измерения, методы аналого-цифрового преобразования данных. В качестве материалов для биоиндикации на этапе предварительных исследований использовалась инфузория туфелька.

Суть предлагаемого способа заключается в комплексном физико-химическом воздействии на обеззараживаемую жидкость вращающегося переменного электромагнитного поля с перемещающимися в нём ферромагнитными материалами. В ходе такого воздействия в среде возникает ряд побочных эффектов таких как: механические колебания и кавитация. Электромагнитные колебания способствуют разрушению ДНК и РНК патогенных организмов, кавитация приводит к разрушению

клеточных стенок и плазматических мембран за счёт схлопывания возникающих под действием механических колебаний пузырьков. Эффектом этих воздействий является прекращение жизнедеятельности находящихся в обрабатываемой таким способом среде организмов. На данном этапе эффективность способа апробирована на простейших.

Предлагаемый способ обладает более высокой экологической безопасностью за счёт отсутствия побочных продуктов обеззараживания, которые присутствуют в большом количестве при использовании химических реагентов, его эффективность не зависит от мутности, кислотности и жёсткости среды, как это происходит в случае применения воздействий волнами ультрафиолетового диапазона, протекающий процесс полностью контролируем и не является сезонным в отличие от биологических способов. Для реализации данного способа разработан индуктор осуществляющий комплекс физико-химических воздействий.

Предложенный способ позволяет существенно снизить уровень загрязнения сточными водами. Развитием результатов является установление эффекта на биоиндикаторах высшей таксономии, промышленные испытания, а также адаптация и оптимизация параметров под иные специфичные условия.

Реконструкция сети постоянных пробных площадей в НП «Лосиный остров»

Миславский Александр Николаевич

МГУ леса, Россия, Мытищи

mislavskij@gmail.com

Данная работа посвящена реконструкции пяти постоянных пробных площадей, находящихся в насаждениях Мытищинского лесопарка национального парка «Лосиный остров». Работа проводилась в сентябре-ноябре 2014 года.

Были обнаружены, обследованы и реконструированы четыре пробные площади, обследование которых ранее проводилось регулярно с 1994 по 1997 годы, реконструкцию одной из пробных площадей провести не удалось, в связи с полным выпадением насаждения в квартале.

После нахождения пробных площадей, был проведен ряд мероприятий по их реконструкции:

- обнаружены центры пробных площадей и восстановлены их границы;
- выявлены и заново отмечены отдельные деревья, по которым ранее проводился учет (визуально, при помощи остатков краски, еще подлежащих идентификации номеров, зарубок);
- для облегчения дальнейшей работы и нахождения пробных площадей, их местоположение было перенесено на электронные карты при помощи системы GPS с высокой точностью привязки;
- использовано несколько вариантов нанесения номеров, с целью установления наиболее эффективного способа отметки деревьев на пробных площадях (масляная краска, нитроэмаль, ламинированная бумага);
- произведена общая визуальная оценка состояния насаждений, а также измерения высоты и диаметров деревьев.

Информация о пробных площадях

Пробная площадь №	Пл ощадь (га)	Ква ртал	Выд ел	Даты учета
9	0,0 5	12	1	1994, 1995, 1996, 1997, 2014
10	0,0 5	12	14	1994, 1995, 1996, 1997, 2014
34	0,0 5	7	2	1994, 1995, 1996, 1997, 2014
36	0,0 5	13	5/6	1994, 1995, 1996, 1997, 2014
37	0,0 5	13	21	1994, 1995, 1996, 1997, 2014

Благодаря проделанной работе удалось установить общую картину изменений, произошедших за последние 17 лет (1997-2014гг.). На данный момент на территории восстановленных пробных площадей ведется активная научная работа, включающая в себя мониторинг текущего состояния насаждений и его прогнозирование. В 2015 году был произведен мониторинг численности вредителей хвойных пород. По результатам проведенной работы и анализа данных за последние 10 лет будет составлен прогноз состояния насаждений с целью разработки методики оздоровления и поддержания оптимального санитарного состояния деревьев на ООПТ НП «Лосиный остров».

Биологическая активность субтропических коричневых красноцветных почв Крыма

Муругина Виктория Сергеевна, Безус Евгения Игоревна
Южный федеральный университет, Россия, Ростов-на-Дону
bezus.finik@yandex.ru kristina.24@bk.ru

В последние годы ландшафты черноморского побережья испытывают высокую рекреационную нагрузку. Для того, чтобы определить их устойчивость в антропогенному воздействию необходимы исследования природных эталонных участков. Заповедник «Мыс Мартьян» (Ялта, Крым) - один из немногих сохранивших типичные ландшафты средиземноморского типа (сообщества из дуба пушистого красно-коричневыми почвами, сформировавшимися на красноцветных продуктах выветривания известняков). Целью работы было исследование биологической активности почв, определенной по общей численности бактерий и активности каталазы. Исследования проводили в мае 2015 года; были заложены два полнопрофильных разреза на типичных по рельефу и растительности участках заповедника.

Разрез №1 заложен в ксерофитном дубовом лесу с разреженным подлеском на южном пологом склоне к морю на высоте 116 м над уровнем моря. Вскипает слабо с 50 см, бурно с 60 см. Почва – коричневая красноцветная слабовыщелоченная на продуктах выветривания известняков. Разрез №2, заложенный в нескольких десятках метров вниз по склону, отличается выщелоченностью от карбонатов по всему профилю, вплоть до глубины 100-110 см. Почва этого участка коричневая красноцветная выщелоченная на

продуктах выветривания (элювио-деллювии) известняков. Причина различий - в дополнительном поверхностном увлажнении почвы второго участка.

Показано, что данные почвы по шкале Д.Г. Звягинцева (1978) относятся к разным категориям обогащенности микроорганизмами. Верхний горизонт первого разреза обладает средней численностью почвенных бактерий (3,2 млрд./г), во втором она низка (1,9 млрд./г). Вниз по профилю численность уменьшалась достаточно плавно, что нехарактерно для лесных почв в целом. Почвы заповедника значительно уступали в численности бактерий другим горным почвам Крыма, расположенным в лесном (буроземы) и луговом (горно-луговые почвы) поясах.

Максимальная активность каталазы среди исследуемых почв Крыма (в том числе горно-луговых, бурых лесных и т.д.) отмечена в коричневых красноцветных почвах заповедника Мыс Мартьян. В результате исследований установлена очень высокая активность каталазы в образцах обоих разрезов – на уровне 22-27 млО₂/г/мин, что значительно превышает таковую в других зональных почвах Юга России (в среднем, в 2,0-2,5 раза). Профильное распределение активности каталазы равномерно убывающее, что характерно для большинства почв. В слабовыщелоченном варианте активность каталазы выше, чем в выщелоченном. Это связано с повышенной активностью каталазы в почвах с высоким содержанием карбонатов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (6.345.2014/К) и государственной поддержке ведущей научной школы Российской Федерации (НШ-2449.2014.4).

Загрязнение почв Васильевского острова Санкт-Петербурга тяжелыми металлами

Опекунова М. Г. , Кошелева Д. И.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург
m.opukonova@mail.ru*

Василеостровский район считается одним из самых неблагоприятных по состоянию окружающей среды в Санкт-Петербурге. Среди многочисленных загрязняющих веществ выделяются тяжелые металлы (ТМ) из-за их токсичности и неспособности к биодegradации; загрязнение почв ТМ сохраняется на многие годы. Интегральным показателем состояния окружающей среды являются почвы, поэтому им уделяется большое внимание при экологическом мониторинге.

Оценка загрязнения Василеостровского района Санкт-Петербурга выполнена на 30 площадках, на каждой из которых отобраны пробы почвогрунтов. Анализ величины рН, содержания сульфатов, валовых и подвижных форм ТМ проведен в лаборатории кафедры геоэкологии и природопользования Санкт-Петербургского университета. Показатель суммарного загрязнения почв Zc определен по Ю.Е. Саету.

Результаты анализа показали, что содержание сульфатов в почвогрунтах невелико (157 мг/кг), показатель рН - слабощелочной (в среднем - 7.8). Среднее валовое содержание цинка и кобальта достигает 2 ОДК, а никеля, кадмия, свинца, меди, марганца и хрома находится в пределах ОДК. Концентрация бария превосходит кларк в 1.5 раза. Для металлов I класса опасности максимальное превышение отмечается в 7 раз (цинк), для металлов II класса опасности – в 4 раза (кобальт), для металлов III класса – в 1.5 раза (барий).

Среднее содержание подвижных форм цинка и свинца соответственно в 3 и 2,5 раза выше ПДК. Концентрация подвижных форм никеля, кадмия, меди, марганца и хрома в среднем близка к ПДК. Для металлов I класса опасности максимальное превышение отмечается в 20 раз (цинк), для металлов II класса опасности – 10 раз (медь).

Значение суммарного показателя загрязнения почв на исследованной территории составляет 64, что соответствует категории «опасного» загрязнения.

Таким образом, почвы исследованной территории отличаются высоким уровнем загрязнения ТМ, опасны для здоровья населения и выступают источником возможного вторичного загрязнения. Наиболее остро стоит проблема загрязнения цинком и свинцом (I класс опасности), медью и кобальтом (II класс опасности), а также барием (III класс опасности).

Плотность и пространственная структура ценопопуляций видов рода *Tulipa* в государственном природном биосферном заповеднике «Черные Земли»

Очирова А.С., Очир-Горяева А.В.

*Калмыцкий государственный университет, Россия, Элиста
ochirowa.alex@yandex.ru*

Работа имела целью охарактеризовать плотность и пространственную структуру ценопопуляций представителей семейства Лилейные (*Liliaceae*) - тюльпана двцветкового (*Tulipa biflora* Pall.) и тюльпана Биберштейна (*Tulipa biebersteiniana* Schult. et Schult.) в пределах государственного природного биосферного заповедника «Черные земли». Оба вида - эфемероиды, луковичные поликарпики, занесены в Красную книгу Республики Калмыкия.

Плотность учитывали на участках площадью 0,5x0,5 м². Производили подсчет числа особей всех возрастных состояний на десяти учетных площадках, расположенных по трансекте.

Ценопопуляции обоих видов произрастали в разных растительных сообществах на бурых пустынно-степных солонцеватых суглинистых почвах. В ценопопуляции *Tulipa biflora* № 1 в трехлетний период исследования частота особей на 0,25 м² варьировала от 7 до 41 особей. Во все годы исследования у растений ценопопуляции № 1 значение показателя больше, чем в ценопопуляции № 2. В обеих ценопопуляциях *Tulipa biflora* наибольшее значение плотности отмечали в 2013 году.

В ценопопуляции *Tulipa biebersteiniana* № 3 в период исследования плотность на 0,25 м² изменялась от 4 до 23 особей. В период с 2013 по 2015 год у растений ценопопуляции № 3 значение показателя несколько больше, чем в ценопопуляции № 4. Наибольшее значение плотности у данного вида отмечали в 2014 году.

Анализ данных температуры и уровня осадков выявил, что на плотность ценопопуляций исследованных видов существенное влияние оказывает объем осадков, выпавших в период, примерно одного месяца, предшествующего активной вегетации вида. Таким образом, ценопопуляции *Tulipa biflora* и *T. biebersteiniana* имели специфическую для условий данного растительного сообщества плотность. Однако на динамику данного показателя оказывают влияние и другие экологические факторы, в частности климатические условия года вегетации.

При анализе пространственной структуры в ценопопуляциях *Tulipa biflora* и *T. biebersteiniana* отмечали случайный тип распределения особей. Случайный характер их

распределения обусловлен, на наш взгляд, способностью данных видов в аридных условиях преимущественно к семенному размножению.

Применение биологических методов в мониторинге процессов восстановления нефтезагрязненных земель

Панина Ю.Ю., Власова А.А.

Российский государственный университет нефти и газа имени И.М. Губкина,

Россия, Москва

yulia.panina222@yandex.ru

Одним из методов мониторинга нефтезагрязнения является определение токсичности почв с помощью различных биологических объектов. Токсичность пробы нефтезагрязненной почвы можно определить как непосредственно в твердом виде, так и в водной вытяжке. Достоверность результатов во втором случае часто вызывает сомнение - большинство компонентов нефти (асфальто-смоло-парафиновые соединения) нерастворимы в воде.

Поэтому проводили эксперимент по определению токсичности нефтезагрязненной почвы с приготовлением водной вытяжки и в твердом образце. Первая приготовлена согласно ГОСТ 26423-85. Токсичность была определена с использованием в качестве биологического тест-объекта энхитреид по методике ФР.1.39.2014.18039. Также была проведена оценка водной вытяжки и твердого образца нефтезагрязненной почвы на фитотоксичность по методике СанПиН 2.1.7.573-96. В качестве нефтезагрязненной почвы в эксперименте были использованы модельные смеси (нефть+почва) с различной концентрацией нефти (0,5; 1; 2; 5%).

По результатам эксперимента было установлено, что фитотоксичное действие нефтезагрязнения в твердом образце почвы проявилось в ингибировании всхожести семян кресс-салата в среднем на 55%. В водной вытяжке, приготовленной из того же образца почвы, фитотоксичность составила 40%. При максимальной концентрации нефти (5%) процент всхожести семян в твердом образце почвы составил 20 %, в водной вытяжке из этой же пробы – 40%. При определении токсичности почвы с использованием энхитреид были получены следующие результаты: при проведении серии экспериментов с использованием водных вытяжек из нефтезагрязненных почв гибель червей составила 5-10 %; в твердом образце почвы - 25-30%.

Опираясь на экспериментальные данные, можно сделать вывод, что сомнения специалистов в области использования водной вытяжки для определения токсичности почв, загрязненных веществами органической природы, обоснованы. Результаты с использованием одного и того же тест-объекта в эксперименте с твердым образцом нефтезагрязненной пробы и в водной вытяжке, приготовленной из той же пробы, различались на 15-20%. Таким образом, данные по токсичности и фитотоксичности нефтезагрязненной почвы, определенные в водной вытяжке, оказались заниженными. Следовательно, необходимо расширить перечень биологических объектов, применяемых в целях биотестирования, с возможностью проведения эксперимента без приготовления водной вытяжки; а также разработать рекомендации в отношении применения определенного набора тест-объектов для различных сред с конкретным составом загрязнения.

Биоустановка для глубокой очистки сточных вод

Плешанов Артем Сергеевич

Вологодский государственный университет, Россия, Вологда

volodastudliga@yandex.ru

Сточные воды малых населенных пунктов и промышленных предприятий являются главным источником загрязнения водных объектов. Для предотвращения негативного воздействия на окружающую среду устанавливаются нормативы допустимых сбросов (НДС) загрязняющих веществ.

В настоящее время на территории Российской Федерации большинство очистных сооружений канализации не обеспечивают нормативное качество очистки сточных вод или вообще не функционируют. В результате в водные объекты сбрасываются плохо очищенные сточные воды, тем самым нанося большой вред флоре и фауне. Для решения экологических проблем, связанных с качеством очистки сбрасываемых сточных вод, необходима разработка как эффективных методов очистки, так и их внедрение.

Целью работы является создание установки для глубокой очистки сточных вод на основе соединения биологического, химического и физического методов очистки.

Биоустановка – новая технология очистки сточных вод, которая включает два уже существующих импортных способа очистки – это SBR реактор и MBBR реактор, их взаимодействие устраняет недостатки обоих. В одном резервуаре последовательно проходят четыре основных этапа очистки сточных вод (наполнение, аэрирование, коагулирование-отстаивание, отвод очищенной сточной воды) с применением прикрепленных микроорганизмов, которые питаются загрязнениями, находящимися в сточной воде. Все этапы очистки полностью автоматизированы.

Новая установка найдет применение для очистки хозяйственно-бытовых сточных вод от малых населенных пунктов и промышленных предприятий, снизит содержание в очищенной сточной воде азота и фосфора, а также аммонийных соединений до НДС. Данную технологию можно использовать как при строительстве новых очистных сооружений, так и при реконструкции существующих.

Биоустановка для глубокой очистки сточных вод уменьшит экологический ущерб и повысит экономический эффект за счет оптимизации эксплуатационных затрат.

Мониторинг качества воды реки Мечи

Саликова Елизавета Геннадьевна

Рязанский Государственный Университет имени С.А.Есенина, Рязань

Liza300497m@yandex.ru

Такие негативные воздействия, как сброс сточных вод в водоемы, загрязнение атмосферного воздуха и почвы отходами промышленного производства и техники, в дальнейшем проявляются в виде изменения качества поверхностных вод. Состоянию качества воды малых рек в России не уделяется должного внимания. Объектом исследования стала река Меча в районе д. Старое Батурино Рыбновского района Рязанской области, где в течение 2009-2014 гг. проводилась оценка качества воды.

Была применена методика Николаева С.Г., также определялась величина биотического индекса. Для проведения исследований использовано следующее оборудование: скребок, закидная драга, широкая емкость с плоским дном.

Из большого арсенала биологического анализа наиболее соответствует целям водного мониторинга – метод биоиндикации, который основан на контроле состояния водных сообществ, постоянно испытывающих весь спектр негативных воздействий.

Принадлежность обследованного участка реки к определенному классу качества вод определяли по максимальной суммарной значимости в ряду с 1 по 5 классы. При оценке качества воды на основе биотического индекса находили величины коэффициентов для каждой группы беспозвоночных, обнаруженных в воде.

В 2009-2010, 2012-2014 гг. вода была оценена 3 классом качества – удовлетворительной чистоты (слабо загрязненная). А в 2011 г. вода была оценена 4 классом качества – загрязненные воды. Причиной ухудшения качества воды в 2011 году послужила смена хозяйственного использования берегов реки Мечи: переход от сенокосных угодий к выращиванию капусты белокочанной, что повлекло использование на ее берегах удобрений и пестицидов, а также использование в летнее время большого количества бензиновых помп для полива полей.

Проведенное исследование и анализ результатов 6-летних наблюдений, позволяют сделать следующие выводы:

1. Вода реки Мечи имеет способность к самоочищению.
2. Состав беспозвоночных - разный по годам.
3. Количество наблюдаемых видов беспозвоночных - разное по годам.
4. Выявлены нарушения санитарных норм размещения пропашных культур от берегов реки.
5. Выявлено использование большого количества бензиновых помп для полива овощей.

Оценка техногенного загрязнения окружающей среды

г. Казани методом лишеноиндикации

Салмин Андрей Сергеевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Россия, Москва

salmin.andrei.93@gmail.com

Поллютанты, попадая в организм людей и животных, вызывают заболевания, порой трудно диагностируемые. Этим определяется актуальность экологического мониторинга городского воздуха. Цель работы: оценка экологической ситуации города Казани и особенностей аккумуляции тяжелых металлов в пробах эпифитных лишайников, произрастающих в районах города с различной экологической обстановкой.

Использовался метод лишеноиндикации. Отсутствие специальных органов водо- и газообмена и крайне низкая способность к авторегуляции приводят к высокой степени соответствия химического состава лишайников и окружающей их среды. Это качество определило широкое использование лишайников как аккумулятивных биоиндикаторов загрязнения среды тяжелыми металлами, соединениями фтора, серы, азота, а также радионуклидами. Отбор проб лишайников проводился в июне 2014 и сентябре 2015 года. Основным методом инструментального определения тяжелых металлов в биообъектах является рентгеноспектральный анализ. Рентгеноспектральный анализ отличается сравнительно простой схемой пробоподготовки и высокой точностью.

В пробах лишайников отобранных в лесопарковой зоне «Дубравная» отсутствуют маркеры антропогенного загрязнения, такие как мышьяк и кобальт. Вблизи предприятий

«Оргсинтез» и «Нэфис Косметикс» отмечается повышенное содержание никеля и хрома, по сравнению с лесопарковыми зонами. Максимальное значение содержания свинца в пробах лишайника отмечаются вблизи Аметьевской магистрали и составляют 34,36 мкг/г. Никель и кобальт в образцах отобранных в лесопарковых зонах не обнаружены. Отмечена сравнительно высокая степень накопления лишайниками железа и меди, до 7148 мкг/г и до 538 мкг/г соответственно. Можно полагать, что соединения данных металлов не оказывают негативного влияния на жизнедеятельность лишайников и могут накапливаться в них в больших количествах.

Вывод: выявлено загрязнение воздуха в г.Казани техногенными отходами – соединениями никеля и хрома. Лесопарковые зоны отличаются повышенной чистотой атмосферного воздуха.

Использование разряда постоянного тока атмосферного давления в очистке воды от ионов Mn^{7+} и Cr^{6+}

Сунгурова Александра Вадимовна

Ивановский государственный химико-технологический университет,

Россия, Иваново

aleksandra.sungurova@mail.ru

Промышленные, бытовые и дождевые городские стоки всегда содержат не только органические, но и неорганические загрязнители. Среди самых опасных из них – соли тяжелых металлов. Возможности плазменных технологий в отношении очистки воды от этих загрязнений практически не изучены. Целью работы было исследование возможностей разряда постоянного тока для реализации процессов восстановления ионов Cr^{6+} и Mn^{7+} , а также выявление влияния параметров разряда и начальной концентрации растворов на эффективность очистки.

Разряд постоянного тока атмосферного давления возбуждали приложением постоянного напряжения до 4 кВ между металлическим анодом и поверхностью раствора. Расстояние анод - поверхность электролита составляло 10 мм, ток разряда 20-80 мА. Раствор готовили растворением навески бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) или перманганата калия ($KMnO_4$) квалификации ч.д.а. в дистиллированной воде. Объем обрабатываемого раствора составлял 70 мл. После определенного времени воздействия определяли концентрацию бихромат-ионов $Cr_2O_7^{2-}$ по поглощению на длине волны 350 нм и перманганат ионов MnO_4^- на длине волны 550 нм.

Действие разряда на раствор сопровождалось снижением pH, которое не зависело от начальной концентрации раствора. В растворе были обнаружены нитрат, нитрит ионы и перекись водорода. Образование пероксида водорода свидетельствует о появлении в растворе радикалов OH и H как продуктов диссоциации молекул воды. Димеризация OH является одним из основных каналов образования H_2O_2 . Частицами, участвующими в реакциях являются OH , H и H_2O_2 .

Разрядное воздействие приводило к восстановлению ионов Cr^{6+} и Mn^{7+} . Причем восстановление Mn^{7+} протекало с существенно большими скоростями. Скорости и степени восстановления зависели от тока разряда. Чем выше ток разряда, тем скорости и степени восстановления выше. При заданном токе разряда степени восстановления зависели от начальной концентрации раствора. Чем концентрация раствора выше, тем степени восстановления меньше.

Обработка разрядом в течение 7 мин привела к снижению потенциальной токсичности в 2,8-1,8 раза в зависимости от начальной концентрации раствора.

Сохранение водно-болотных комплексов и увеличение их экологической емкости

Тарасова Алёна Андреевна

Курский государственный университет, Россия, Курск

tarasova_a_a@mail.ru

В настоящее время остро стоит вопрос о сохранении водно-болотных комплексов (ВБК). С помощью учета птиц на постоянных маршрутах в гнездовой и послегнездовой период установили, что доля типичных водно-болотных видов птиц в типичной лесостепной зоне Курской области составляет всего 8-12%, в то время, как виды, гнездящиеся в зарослях околководной растительности, составляют 25-30%, а 45-50% приходится на сопутствующие виды. Относительно высока численность видов, которые лишь кормятся в ВБК, до 4%.

По этим данным можно сделать вывод о малой пригодности пойменных ВБК типичной лесостепи для основных экологических групп птиц: водоплавающих, водно-болотных, водно-береговых. Это связано с зарастанием акваторий и ухудшением гидрологического режима (падение среднегодового расхода воды на 27-32% при практически полном отсутствии половодья).

Охрана местообитаний этих видов требует высокого половодья при относительно высоком и стабильном уровне воды в межень, без резкого поднятия воды в апреле – мае. Но уровень половодья определяется климатом, его тяжело регулировать деятельностью человека. Раньше существовала государственная программа лесомелиоративных мероприятий на основе травопольной системы земледелия. Сейчас её нет, а прилегающие территории находятся в различных формах собственности. Поэтому необходима регуляция самих водотоков.

Выход находится в использовании подпоров для водяных мельниц, имеющих ряд преимуществ по сравнению с обычными плотинами: 1. «Каскадность» от их частого расположения дает возможность поддерживать постоянный уровень без образования водохранилищ. 2. Постоянный сброс воды обеспечивает аэрацию в зимний период. 3. Поднятие щитов плотин предотвращает заиливание русла и не создает помех нерестовых миграций рыб. 4. Регуляция гидрологического режима не допускает высоких весенних паводков и затопления птичьих гнезд. 5. Относительная стабильность гидрологического режима, вызывающая стабильность орнитокомплексов поймы и прилегающих к ней экосистем. Такого недостатка, как раздвоение русла, можно избежать созданием переливных подпоров на месте спрямленных русел. Таким образом, каскад переливных подпоров даст возможность регулирования уровня воды и степени затопления луговины, что в свою очередь привлечет представителей различных экологических групп птиц.

Анализ снежного покрова в районе Тобольской промзоны
Факашук Н.Ю.

Тюменский Государственный Университет, Россия, Тюмень
fakashuk@yandex.ru

Вопросы охраны атмосферного воздуха в городах где градообразующими предприятиями нефтехимической отрасли являются в наши дни очень актуальными. Атмосферный воздух в таких городах является загрязнённым в результате промышленных выбросов и одним из таких городов является г.Тобольск. В промзоне города расположены такие крупные предприятия, как ООО “Тобольск - Полимер”, ООО “Тобольск - Нефтехим”, Тобольская ТЭЦ и строящийся “ЗапСибНефтехим”.

Чтобы оценить состояние атмосферы Тобольской промзоны, мы использовали данные химического анализа снежного покрова. В пробах снега определялись: взвешенные вещества, рН, удельная электропроводность (УЭП), нефтепродукты, сульфаты SO_4 , нитраты NO_3 . Отбор 10 проб снега (включая фоновую) производился в I декаде марта.

Концентрация взвешенных веществ не превышает фоновое значение (за исключением двух точек с незначительным превышением). рН колеблется в пределах 5,98-6,55. Из литературных источников известно, что у снега в естественном состоянии слабокислая реакция в пределах 5.2 – 5.8 Нейтральная и слабощелочная реакция снежного покрова промзоны г. Тобольска может свидетельствовать о наличии значительных количеств золы и сажи в выбросах предприятий. Наблюдается превышение фоновой концентрации по нефтепродуктам по мере удаления от источника выбросов (максимальная концентрация выше фона в 12 раз). Вероятно, превышение концентрации связано с выбросами от нефтехимических предприятий Тобольской промзоны. Удельная электропроводность, концентрация нитратов и сульфатов не превышают фона.

Таким образом, на исследуемой территории загрязнение атмосферы от предприятий Тобольской промзоны незначительно, однако всё же назвать ситуацию благоприятной нельзя. Планируется продолжить изучение химического загрязнения природных сред данного района (атмосферного воздуха, почвенного покрова, поверхностных и грунтовых вод).

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Изучение криоустойчивости меристем рябины (*Sorbus L.*), изолированных из растений *in vitro*

Балекин Андрей Юрьевич

Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва
aub46@rambler.ru

В жидком азоте растительный материал, устойчивый к замораживанию, может сохранять свою жизнеспособность десятилетиями. Поскольку криосохранение считают экономически выгодным способом сохранения коллекций растений, в том числе размножаемых вегетативно, исследовали особенности посткриогенного восстановления *in vitro* растений рябины. Для эксперимента были выбраны два сорта рябины селекции Ивана Владимировича Мичурина (Титан и Мичуринская десертная). Активно растущие весенние побеги растений, высаженных на территории ИФР РАН, использовали для получения культур *in vitro*. Верхушки побегов (2-3 см) стерилизовали в 1% растворе сулемы 10 минут и промывали стерильной дистиллированной водой. От этих побегов отделяли апексы (2-3 мм) и помещали их на агаризованную среду MS (0,5 мг/л БАП). Через 2 недели апексы формировали побеги, которые затем размножали на среде MS (2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК). Полученные в результате размножения побеги (1,5-2,0 см) шесть недель адаптировали к холоду на среде MS (БАП 0,2 мг/л, ИМК 0,02 мг/л и 60г/л сахарозы) при 2°C, 4 часовом дне и освещённости 2-3 клк. От этих побегов отделяли апексы (1-2 мм) и помещали их на модифицированную среду MS, дополненную 0,8 М сахарозы. Через 48 часов апексы переносили на полоски стерильной фольги и подсушивали 4 часа в потоке воздуха ламинар-бокса. Полоски с дегидратированными апексами в криоампулах погружали в жидкий азот на срок не менее часа. Затем растительный материал оттаивали при комнатной температуре. Посткриогенное восстановление роста проводили на агаризованной среде MS (0,5 мг/л БАП) при 18-20°C, 16-часовом дне и освещённости до 1 клк. Долю апексов, восстановивших рост после жидкого азота, оценивали через месяц после их размораживания. После криосохранения жизнеспособные побеги сформировали 71% апексов рябины сорта Мичуринская десертная и 61% апексов сорта Титан. Таким образом, после некоторой модификации метод, который ранее успешно применяли для криосохранения дегидратированных апикальных меристем ежевики и земляники (патент РФ № 2302107), можно также эффективно эксплуатировать при формировании криоколлекций ценных сортов и клонов рябины без использования дорогостоящих программируемых замораживателей и токсичных криопротекторов.

**Сравнительная анатомо-морфологическая характеристика двух генотипов
томата в условиях NaCl засоления *in vitro***

Богоутдинова Лилия Рашидовна^{1,2}, Халилуев Марат Рушанович¹

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

² ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени
К.А. Тимирязева, Россия, Москва

bogoutdinova_lr@rambler.ru, marat131084@rambler.ru

Засоление – один из главных стрессовых факторов, лимитирующих выращивание сельскохозяйственных культур. В настоящее время крайне ограничено количество исследовательских работ, посвящённых изучению воздействия солевого стресса на структуру тканей растений. Целью исследования являлось изучение влияния хлоридного засоления на растения томата на организменном, тканевом и клеточном уровнях в условиях *in vitro*. Объектом для изучения служили асептические проростки томата двух генотипов (линия ЯЛФ и сорт Рекордсмен), культивируемые *in vitro* на среде с добавлением различных концентраций NaCl (0 – 250 мМ). Впоследствии был проведен учет по морфометрическим характеристикам корней и побеговой части проростков, интенсивности темнового дыхания и фотосинтеза. В дальнейшем растительный материал (фрагменты корней, гипокотилей, а также семядольных листьев) фиксировали для изучения влияния засоления на структурную организацию клеток тканей методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

Хлоридное засоление оказало негативное влияние на ростовые и физиолого-биохимические показатели у исследуемых генотипов томата. Продемонстрированы существенные различия между генотипами томата в условиях засоления по накоплению сырой и сухой биомассе корней и побеговой части проростка, интенсивности темнового дыхания и фотосинтеза. В ходе цитологического исследования выявлены существенные отличия по размеру и форме эпидермальных и паренхимных клеток коры гипокотыля между двумя генотипами. Воздействие токсичных ионов Na⁺ и Cl⁻ оказывало существенное влияние на размер, а также форму клеток исследуемых тканей у обоих генотипов. Установлено, что эпидермальные и паренхимные клетки гипокотыля томата сорта Рекордсмен менее чувствительны к присутствию в среде NaCl, по сравнению с линией ЯЛФ. При гистологическом анализе семядольных листьев томата линии ЯЛФ и сорта Рекордсмен выявлены различия в анатомическом строении эпидермальных и мезофильных клеток семядолей между исследуемыми генотипами. С увеличением концентрации NaCl в составе питательной среды выше 50 мМ происходило уменьшение толщины семядольной пластинки у обоих генотипов. По данным ультраструктурного анализа установлено, что при культивировании проростков томата линии ЯЛФ в условиях 150 мМ NaCl наблюдались необратимые повреждения в клетках мезофилла семядольных листьев и нарушения фотосинтетического аппарата (у большинства хлоропластов наблюдались изменения структуры тилакоидов гран и стромы). Однако в клетках губчатого мезофилла семядолей томата сорта Рекордсмен подобных изменений не наблюдалось. Таким образом, по результатам исследований было показано, что изученные генотипы томата имеют между собой отличия по солеустойчивости. Установлено, что по морфометрическим, физиолого-биохимическим и цитологическим параметрам томат сорта Рекордсмен более устойчив, чем линия ЯЛФ. Изменения в размере и форме клеток

различных тканей и органов могут использоваться в качестве цитологических маркеров для сравнительной оценки генотипов томата по чувствительности и/или устойчивости к засолению.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01331 мол_а.

Взаимоотношения некоторых видов растений семейства Сельдерейные (*Ariaceae* L.) с культивируемыми видами растений

Бударин С.Н.¹, Лизунова И.Е.²

¹*Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений*

²*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, агрономический факультет, Россия, Москва
snegin20000@rambler.ru*

Довольно много среди растений семейства Сельдерейные *Ariaceae* лекарственных растений, которые содержат большое количество кумаринов и их производных (амми, укроп, борщевик). Некоторые виды засоряют посевы (бутень, сныть, укроп), особенно борщевик Сосновского (*Heraclium sosnowskyi* Manden), и большинство из них обладают инвазивностью и тем самым являются объектами исследований проблемы аллелопатии, т.е. взаимоотношений растений в агро- и фитоценозах. Цель работы – изучение влияния экстрактов из плодов борщевика и Амми большой (*Ammi majus* L.) на рост и развитие проростков некоторых культивируемых и лекарственных видов растений.

Исследования проводились с помощью методики био-тестов, в качестве тест-растений использовались: редис посевной, овес обыкновенный и ромашка аптечная.

Так, слабые разбавления (1:10) экстрактов из плодов борщевика заметно ингибировали энергию прорастания редиса (> 28%), овса (> 25%) и ромашки (44%). Сильно разбавленные растворы сока из листьев борщевика (1:100) оказывают ощутимое стимулирующее действие на энергию прорастания и всхожесть тест-растений. Наблюдаемые эффекты вызваны содержанием в плодах борщевика аллелохимикалий, которые при совместном прорастании с семенами других видов могут оказывать негативный или стимулирующий эффект.

Экстракты из плодов амми при слабом разбавлении (1:10) также обладают ингибирующими эффектами для редиса и овса (на 40%) и ромашки аптечной (до 75%). При сильном разбавлении (1:100) только ромашка аптечная испытывала ингибирование, тогда как редис и овес испытывали некоторую стимуляцию. Было установлено, что водорастворимые вещества борщевика и амми являются ингибиторами прорастания некоторых растений примерно в равной степени. Очевидно, что в плодах растений борщевика и амми содержатся аллелохимикалии, слаборазбавленные водные растворы которых негативно влияют на энергию прорастания и всхожесть семян тест-растений.

Таким образом, содержащиеся в экстрактах из плодов растений семейства Сельдерейные аллелопатически активные вещества играют определенную роль в естественных фитоценозах. Лабораторные условия показывают утрированные эффекты, тогда как природные условия сглаживают эти взаимосвязи в фитоценозе. Но эти данные иллюстрируют характер взаимоотношений растений и в дальнейшем станут ключом в раскрытии механизмов взаимодействий в растительном сообществе.

Сравнение кратковременного воздействия салициловой и *n*-оксибензойной кислот на накопление фенольных соединений в каллусной культуре чая

Голубева Е.В.¹, Нечаева Т.Л.², Назаренко Л.В.¹

¹ГАОУ ВО «Московский городской педагогический университет», Россия, Москва

²ФГБУН Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН,

Россия, Москва

liza2893@bk.ru, NechaevaTatyana.07@yandex.ru

Для высших растений характерно образование различных фенольных соединений (ФС), в том числе и оксибензойных кислот, относящихся к простым ФС С₆-С₁ ряда. Одним из их представителей является салициловая кислота (СК), которая в настоящее время рассматривается как полифункциональный регулятор, принимающий участие в ростовых, сигнальных, адаптивных процессах растений. Ее ближайшим аналогом является *n*-оксибензойная кислота (ОК), имеющая ту же структурную формулу, что и СК, но отличающаяся по положению гидроксильной группы в кольце. Однако функциональная роль этого соединения исследована крайне мало.

Целью работы являлось изучение кратковременного воздействия СК и ОК на каллусную культуру чайного растения и накопление в ней различных классов ФС – фенилпропаноидов (ФП) и флаванов (ФЛ).

Каллусную культуру стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L.) выращивали в темноте на модифицированной питательной среде Хеллера. При проведении опытов каллусы (возраст 27 дней) выдержали в течение 2 часов в воде (контроль) или водных растворах СК или ОК (10⁻⁵ М), после чего поместили на свежую питательную среду. Материал анализировали через 24 часа и после 7-ми суток культивирования. ФС извлекали 96% этанолом. В экстрактах определяли содержание ФП (прямое спектрофотометрирование при 330 нм) и ФЛ (по реакции с ванилиновым реактивом при 500 нм).

Кратковременное воздействие СК и ОК на каллусные ткани чая вызывало изменения в накоплении в них ФС. Количество биогенетически ранних ФС, а именно ФП (соединения С₆-С₃ ряда), в каллусах повышалось через 24 часа после обработки (практически в равной степени у обоих вариантов), а через 7 суток снижалось, особенно в варианте с СК. Что же касается флаванов (соединения С₆-С₃-С₆ ряда), то в этом случае тенденция была противоположной – первоначально (через 24 часа) изменений в их накоплении не наблюдалось, а через 7-суток оно повышалось (в большей степени в варианте с СК).

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что поступление СК и ОК в каллусные культуры чая вызывает практически одинаковый ответ клеток: быстрая активация фенилпропанидного пути фенольного метаболизма и, как следствие, накопление ФП, и в дальнейшем – активация флавоноидного пути и накопление ФЛ.

Влияние узкополосного красного и синего света на ультраструктуру и энергопреобразующие процессы тилакоидных мембран хлоропластов ячменя *Hordeum vulgare* (L.).

Горшкова Д.С.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии растений, Россия, Москва
stanisa-2002@yandex.ru*

Светодиодные светильники, испускающие свет узкой спектральной полосы, рассматриваются как перспективные источники освещения при выращивании растений в интенсивной светокультуре. Однако спектральный состав света оказывает существенное и неоднозначное влияние на жизнедеятельность растений. В связи с этим необходимы исследования, обосновывающие выбор оптимальных источников освещения растений.

Целью данной работы являлось изучение действия узкополосного красного и синего света на организацию и функционирование тилакоидных мембран хлоропластов. Работа выполнена на 9-дневных проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Растения выращивали при фотопериоде 16/8 часов и освещении узкополосным красным (660 нм) и синим (450 нм) светом. Контролем служили растения, выращенные под люминесцентными лампами. Интенсивность освещения на уровне посева составляла 70 мкмоль квантов/(м²*с).

Исследования ультраструктуры хлоропластов методом трансмиссионной электронной микроскопии показали, что в энергизованном состоянии на свету хлоропласты, сформированные на синем свету, имеют высокоорганизованную структуру, аналогичную контролю. В то же время хлоропласты, сформированные на красном свету, обладают структурой, соответствующей условиям низкой интенсивности освещения: значительной долей гранальных тилакоидов и неупорядоченной структурой тилакоидных мембран. Структура хлоропластов, сформированных на узкополосном синем и красном свету, практически не изменяется за 6-часовой период темноты, в то время как структура хлоропластов контрольного варианта претерпевает заметные изменения. Таким образом, хлоропласты, сформированные на красном и синем узкополосном свету, характеризуются сниженной динамичностью системы внутренних мембран по сравнению с контролем. При этом в хлоропластах, сформированных на красном свету, в опытах *in vivo* при формировании электрохимического градиента протонов происходит изменение соотношения параметров энергизации тилакоидных мембран (ΔpH и $\Delta \psi$), а также снижение активности циклического фотофосфорилирования в опытах *in vitro* по сравнению с контролем. С другой стороны, высокоорганизованная стабильная структура хлоропластов, сформированных на синем свету, сопровождается увеличенной активностью циклического фотофосфорилирования по сравнению с контролем и аналогичным контролем соотношением параметров энергизации тилакоидных мембран.

Таким образом, особенности ультраструктуры тилакоидных мембран и их динамичности у хлоропластов растений, выращенных на узкополосном красном и синем свету, наряду с другими факторами могут определять различия в функционировании энергопреобразующих систем хлоропластов *in vivo* и *in vitro*.

**Накопление флавонов в каллусной ткани шлемника байкальского
(*Scutellaria baicalensis* Georgi)**

Дикая Варвара Сергеевна¹, Олина Анна Викторовна^{1,2}

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН, Москва
var_di@mail.ru, anya_olina@mail.ru

Шлемник байкальский – растение, широко используемое в традиционной медицине Китая, Монголии и Сибири, поскольку в его корнях содержатся фармакологически ценные флавоны – байкалеин, байкалин, вогонин и вогонозид, обладающие широким спектром действия, в том числе и противоопухолевым. Интенсивное использование шлемника и ограниченность его природного ареала делает целесообразным применение биотехнологических подходов для альтернативного получения растительного сырья. Действительно, выращивание шлемника в виде каллусных, суспензионных и корневых культур гарантирует круглогодичное получение растительной биомассы вне зависимости от сезона и погодных условий. Целью данного исследования был анализ содержания флавонов в каллусных тканях шлемника байкальского на протяжении цикла культивирования. Для выращивания каллусов использовали среду Гамборга с добавлением 1 мг/л кинетина и 1 мг/л 2,4-Д, культивирование проводили при 24°C в темноте в течение 5 недель. Определение флавонов проводили с помощью ВЭЖХ-анализа. Было показано, что в каллусных тканях присутствуют все основные флавоны (байкалин, байкалеин, вогонин и вогонозид), характерные для корней интактных растений. Однако наблюдалось накопление преимущественно байкалеина и его глюкуронида байкалина, тогда как содержание вогонина и вогонозида значительно ниже. Изучение динамики содержания флавонов в течение цикла выращивания показало, что их суммарное количество изменялось в пределах 1-3% от сухой массы, причем максимальное содержание было зарегистрировано на 4-е и 36-е сутки выращивания. Отмечено, что в течение первых двух недель культивирования среди флавонов преобладал байкалеин (92% от суммы флавонов), тогда как на 3-4 неделе 99% от суммарного содержания флавонов составил байкалин. Таким образом, в результате проведенной работы показано изменение качественного и количественного содержания флавонов в течение цикла культивирования каллусной ткани шлемника байкальского и выявлены сроки, оптимальные для получения тех или иных биологически активных флавонов.

Пролиферативный потенциал клеток растений при моделировании эффектов микрогравитации в наземных условиях

Досина Маргарита Олеговна

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Беларусь, Минск

Pochta_margo@mail.ru

Исследования в космическом полете и при моделировании эффектов микрогравитации на Земле свидетельствуют о том, что нет живых систем, развитие которых бы не менялось в этих необычных условиях. Так в условиях космического полета происходит снижение пролиферативной активности клеток растений. Цель выполняемого научного исследования заключается в поиске оптимальных видов растений, которые сумеют адаптироваться к условиям микрогравитации. Одним из основных критериев такой устойчивости является пролиферативная активность клеток растений.

Сопоставимые процессы пролиферации растений в земных и космических условиях позволят обеспечить астронавтов и будущих поселенцев на планетах Солнечной системы гарантированными условиями для потребления в пищу растений.

В качестве объекта исследования выбраны семена растений кресс-салата, гороха и риса. Для сопоставления пролиферативной активности клеток растений использовали 3 серии экспериментов: 1 – чашка Петри с семенами растений располагалась вертикально (естественное действие гравитации), 2 – осуществляли поворот чашки Петри с семенами на $\angle 90^\circ$ по часовой стрелке (модель естественного действия гравитации после поворота на $\angle 90^\circ$), 3 – осуществляли клиностамирование 10 об/мин по часовой стрелке чашки Петри с семенами (модель микрогравитации в наземных условиях). Клиностамирование растений осуществляли 4 часа при 10 об/мин по часовой стрелке (clinostat UN-KTM2). Оценку пролиферативной активности клеток корня растений определяли по изменению прироста корня. Фотографирование проводили фотоаппаратом Fugifilm Finepix HS25EXR. Конкретно, фотографировали объекты в чашке Петри непосредственно после размещения семян в 7 мм слое агара (начало наблюдения – 0 часов), через 24 часа наблюдения, каждые 30 минут с 24 до 28 часов на протяжении 4 часов клиностамирования и через 48 часов наблюдения.

Сравнительный анализ при моделировании микрогравитации интенсивности пролиферативных процессов в корневой системе риса, гороха и кресс-салата выявил более интенсивные процессы у риса и гороха. Однако сопоставление результатов прироста корня у всех трех растений (рис, горох, кресс-салат) при моделировании микрогравитации с приростом корня у этих же растений в естественных условиях позволяет заключить о вполне комфортных условиях развития изученных растений в условиях микрогравитации.

Влияние нитрата свинца на прораствание семян и рост проростков озимой пшеницы сорта «Куяльник»

Задиранова Наталья Сергеевна

*Таврическая академия Крымского федерального университета имени В.И.Вернадского,
Россия, Симферополь
Zadiranovanata@mail.ru*

Проблема загрязнения окружающей среды остается острой в настоящее время. Особое внимание уделяется негативному влиянию тяжелых металлов на сельскохозяйственные растения. Проблема усугубляется тем, что тяжелые металлы не разлагаются и содержание их в среде со временем все возрастает.

Загрязнение почвенных угодий сельскохозяйственных районов Крыма солями тяжелых металлов превышает предельно допустимые концентрации в несколько раз. Задачей наших исследований явилось изучить влияние ацетата свинца на прораствание семян и морфометрические характеристики проростков озимой пшеницы сорта «Куяльник» на ранних этапах онтогенеза.

Исследования проводились с семенами и проростками озимой пшеницы сорта «Куяльник». При постановке опыта семена проращивали в кюветах на растворах с различной концентрацией нитрата свинца (10^{-1} – 10^{-5} М), контроль – отстоянная водопроводная вода. В подборе концентраций руководствовались литературными данными. Продолжительность эксперимента составляла две недели. Согласно ГОСТу 12038-84 энергию прораствания семян определяли на 4 сутки, а всхожесть – на 7-ые.

Проростки высаживали в вегетационные сосуды на среду Кнопа, добавляя соль свинца определенной концентрации. Реакцию проростков пшеницы на действие ионов свинца оценивали по высоте проростков, длине корневой системы, по изменению накопления массы сырого и сухого вещества.

В результате исследования было выявлено негативное влияние нитрата свинца в высоких концентрациях на физиологические процессы прорастающих семян и проростков пшеницы.

Соли свинца 10^{-1} М полностью ингибировали прорастание зерновок пшеницы, а при концентрации 10^{-2} М и 10^{-3} М всхожесть составляла 72,6% и 79,4%, что ниже контрольных значений в среднем на 20,6%. Низкие концентрации металла не оказали достоверного влияния на энергию прорастания и всхожесть семян по сравнению с контролем.

Морфометрические параметры проростков реагировали на присутствие металла в растворе в зависимости от его концентрации. Сильное токсическое действие свинца проявлялось в растворах с концентрацией 10^{-2} – 10^{-3} М, что выражалось в замедлении роста проростков, накоплению массы сырого и сухого вещества, а к 14 дню в 10^{-2} М растворе наблюдалось резкое торможение роста. Высота надземной части проростков составляла 24,3% от контроля, а масса сухого вещества – 16,2%. Низкие концентрации металла в растворе (10^{-4} - 10^{-5} М) не влияли на рост и развитие проростков, показатели сравнимы с контрольными.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что высокие концентрации свинца в растворах неблагоприятно влияют на физиологические процессы проростков пшеницы.

Воздействие наночастиц металлов на биосинтез БАВ в суспензионной культуре *Silybum marianum* L.

Ковзунова Ольга Викторовна

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Республика Беларусь, Минск
olga-kopa@mail.ru*

Использование клеточных культур ценных лекарственных растений может служить альтернативным источником для получения биологически активных веществ (БАВ). В качестве потенциального модификатора метаболизма суспензионной культуры *S. marianum* L. был выбран комплексный препарат наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» в 4 исследуемых концентрациях (1,5; 0,15; 0,015 и 0,01 мг/л культуральной среды).

Тестируемым параметром было содержание флавоноидов и оксикоричных кислот (ОКК). Биологические эффекты препарата «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» оценивали на суспензионной культуре, полученной от корневого и стеблевого каллуса *S. marianum* двух рас.

Нами было установлено, что внесение в культуральную среду препарата наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» увеличивало содержание вторичных метаболитов в суспензионной культуре расторопши пятнистой. Так, внесение препарата в корневую культуру расторопши сорта Золушка в концентрации 0,01 мг/мл увеличивало содержание флавоноидов и ОКК до 162%, а в стеблевой культуре до 172 и 200% соответственно. В то время, как концентрация 1,5 мг/л практически не влияла на

стеблевую культуру и угнетала биосинтез в корневой. Схожая ситуация наблюдалась и при внесении препарата в суспензионную культуру, инициированную из сортообразца Sibilla венгерской селекции. Максимальное накопление вторичных метаболитов отмечено при внесении препарата в концентрации 0,015 мг/л среды. В корневой и стеблевой культуре биосинтез флавоноидов и ОКК увеличился в 1,8 раз по сравнению с контролем.

Увеличение содержания вторичных метаболитов в суспензионной культуре зависела от количества наночастиц в культуральной среде, происхождения суспензионной культуры и расы растения. Для расторопши белорусской селекции оптимальной концентрацией является 0,01 мг/л, а для венгерской расторопши пятнистой под рабочим названием Sibilla — 0,015 мг/л. Подобранные концентрации препарата «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» можно использовать как модификаторы метаболизма БАВ суспензионными культурами *Silybum marianum* L.

Работа выполнялась в рамках ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологии» и гранта аспиранта НАН Беларуси.

Каротиноиды: обеспечение и контроль состава в сырье *Calendula officinalis* L.

*Лаптинская Полина К.*¹²

¹ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Россия, Москва

²МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Россия, Москва
polinalaptinskaya@gmail.com

Каротиноиды – группа веществ природного происхождения, представленных тетратерпенами или их производными. Отдельные соединения группы, обладающие биологической активностью в организме человека, (β -каротин, ликопин, лютеин и зеаксантин) входят в состав препаратов-нутрицевтиков. На данный момент наиболее эффективным способом получения каротиноидов является экстракция из растительного сырья, в качестве которого часто используют сухие цветки календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), состав которых зависит от сроков посева, условий произрастания растений (свойства почвы, влажность, температурный и световой режимы, питание растений, и др.) и сроков сбора соцветий.

Проведен вегетационный опыт по выявлению закономерностей роста и развития календулы сорта «Кальта» на гумусово-аккумулятивном слое чернозема обыкновенного с применением двух доз цинкосодержащего препарата (Zn^{2+} : 20 мг/кг почвы и 50 мг/кг почвы), на фоне азота и без его внесения.

Определение качественного и количественного состава каротиноидов, содержащихся в цветках календулы, производилось методом ВЭЖХ с предварительным выполнением поиска оптимальной системы растворителей и внешних условий для экстракции, условий омыления, очистки, а также условий для проведения хроматографирования.

В ходе наблюдений установлено, что за весь вегетационный период наибольшее количество соцветий календулы образуется в варианте опыта с высокой концентрацией цинка и наличием азотного удобрения. Для экстрагирования каротиноидов из сухого сырья выбрана система растворителей – ацетон/гексан (2:3, v/v) в присутствии антиоксиданта ионола. Омыление экстрагированных веществ предложено проводить 30% метанольным раствором КОН. Для проведения анализа на приборе ВЭЖХ рекомендуется

использовать колонку, стационарная фаза которой имеет цианопропильную модификацию (CN-RP). Установлено, что отношения фракций к общему содержанию каротиноидов в экстрактах цветков календулы, выращенной в разных вариантах вегетационного опыта неодинаково. Наибольшее общее содержание каротиноидов определено в сырье варианта, где совместно применяли азотное и цинковое удобрения (до 24,2 мг%), наименьшее - в цветках контрольного варианта опыта (11,7 мг%). Наибольший выход фракций индивидуальных соединений за весь вегетационный период отмечен в варианте с применением азота и максимальной дозы цинкосодержащего препарата.

Экспериментально показана возможность регулирования качественного и количественного состава каротиноидов в цветках *Calendula officinalis* путем внесения удобрений, содержащих азот и цинк. Разработанная методика определения каротиноидов на приборе ВЭЖХ воспроизводима и может быть использована для биохимического контроля получаемого сырья.

Экспрессия гена *cycD3* и содержание H_2O_2 и по в каллусных культурах гречихи с разной пролиферативной активностью

Лугманова А.Ф., Акулов А.Н.

КИББ КазНЦ РАН, Россия, Казань

AnisaLugmanova@gmail.com

Важной проблемой физиологии растений является познание сущности процессов роста, клеточной дифференциации и морфогенеза. Ее решение возможно путем моделирования этих процессов в культуре клеток и тканей с применением методов молекулярной биологии и генетики. Одним из известных регуляторов пролиферации клеток и клеточного цикла у растений является циклин D3. С другой стороны известно, что в регуляции ростовых процессов могут принимать участие активные формы кислорода и азота. Целью данной работы заключалась в выявлении взаимосвязи между экспрессией гена клеточного цикла *CYCD3*, ростовыми процессами и редокс-статусом клеток неморфогенных каллусов гречихи, различающихся по гормонозависимости.

В работе были использованы неморфогенные каллусы гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. Неморфогенный каллус линии 1–8р был отселектирован как клон, спонтанно возникший на морфогенном каллусе. Неморфогенные гормононезависимые каллусные линии 1-8р б/г получали переносом неморфогенных культур на среду RX без добавления гормонов.

Обнаружено, что привес сырой биомассы и митотический индекс гормонозависимого каллуса был в 1,5 раза выше по сравнению с культурой, растущей в отсутствие экзогенных гормонов. Выявлено, что экспрессия гена *CYC D3* в гормонозависимом каллусе в 24 раз выше по сравнению с гормононезависимой культурой. Усиление экспрессии гена *CYC D3* предшествовало увеличению митотического индекса в обеих культурах. В гормонозависимом каллусе увеличение содержания перекиси водорода сопровождается нарастанием митотической активности, начиная с 4-х суток культивирования, что позволяет говорить о стимулирующем влиянии перекиси водорода на пролиферативную активность. Однако при дальнейшем культивировании содержание перекиси водорода продолжает увеличиваться, что вероятно обусловлено ее участием в растяжении клеток, размер которых возрастает после 4-х суток пассажа. В гормононезависимом каллусе, содержание H_2O_2 и митотическая активность

практически не меняется. Это позволяет говорить о том, что в гормонезависимом каллусе H_2O_2 участвует только в стимуляции пролиферации клеток, но не в их растяжении. В культуре, выращиваемой на среде без добавления гормонов, содержание NO в 2,5 раза выше, чем в культуре, растущей на среде с гормонами. Такие различия могут быть следствием, как в особенностях метаболизма азота, так и в различном уровне фитогормонов в клетках гормонозависимого и гормонезависимого каллусов. Предположено, что исключение гормонов из среды культивирования неморфогенных каллусов приводит к изменению редокс-статуса культур, что в свою очередь влияет на пролиферативную активность клеток путем изменения экспрессии гена *CYC D3*.

Прямое участие эндоцитозных везикул в транспорте Na^+

Майорова О.В., Воронков А.С., Халилова Л.А., Фоменков А.А.

Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва

oli-ifr.ran@mail.ru

Непосредственное участие везикул в переносе ионов – новая область исследования механизмов ионного гомеостатирования клеток. Ранее с помощью флуоресцентного зонда на эндоцитоз FM 4-64 нами была показана стимуляция образования эндоцитозных структур (ЭС) хлористым натрием в клетках корня галофита *Saltissima*. Цель настоящей работы – показать участие эндоцитоза в переносе Na^+ из апопласта в клетки в суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana*. Ионы Na^+ в клетках определяли, регистрируя флуоресценцию Na^+ -чувствительного зонда ANG-2 с помощью флуоресцентного микроскопа. Использовали непроникающую через мембраны форму ANG-2, позволяющую определять натрий, интернализированный только эндоцитозным путем, но не поглощенный через ионные транспортеры. ЭС в клетках регистрировали, используя FM4-64. Относительное содержание Na^+ в ЭС определяли с помощью количественного анализа колокализации флуоресценции FM и ANG. Степень колокализации оценивали по коэффициенту Пирсона и коэффициентам колокализации, используя программное обеспечение Axiovision.

Проведенные эксперименты выявили точечную флуоресценцию FM и ANG в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*. Совмещение изображений с красной флуоресценцией FM и зеленой флуоресценцией ANG после инкубации растительного материала в присутствии обоих зондов и 100 мМ NaCl обнаружило совпадение точечной флуоресценции двух зондов, свидетельствуя о нахождении Na^+ в ЭС. По мере развития эндоцитоза в ходе двухчасовой инкубации клеток в питательном растворе, содержащем 100 мМ NaCl и флуоресцентные зонды, интернализация Na^+ и обоих зондов клетками усиливалась, возрастал коэффициент Пирсона и коэффициенты колокализации, что свидетельствует об увеличении степени колокализации эндоцитозных везикул и Na^+ и, следовательно, о поглощении Na^+ образующимися ЭС.

Полученные результаты прямо указывают на нахождение Na^+ в люмене ЭС, а также на определенный вклад эндоцитоза в накопление Na^+ и Cl⁻ клетками при засолении. Таким образом, наряду с традиционной функцией регуляции содержания мембранных белков, в частности ионных транспортеров, эндоцитоз непосредственно участвует в транспорте ионов и в их депонировании в вакуолях.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-04712а.

**Исследование структуры геномов органелл у хлорофилл-дефицитных
утантов подсолнечника с внеядерным типом наследования**

Макаренко Максим Станиславович, Шамова Татьяна Владимировна

*Академии биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского
Южного федерального университета, Россия, Ростов-на-Дону
mcmakarenko@yandex.ru*

Хлорофильные мутанты *chlorigina* являются хорошей моделью для изучения механизмов, регулирующих синтез пигментных и белковых компонентов фотосинтетического аппарата. Локализация генетических изменений у данных мутантов способствует изучению такого сложного и фундаментального процесса как фотосинтез. Целью работы было исследование структуры геномов органелл у внеядерных мутантов подсолнечника с нарушением метаболизма хлорофилла.

Объектами исследования служили растения подсолнечника (*Helianthus annuus*): исходной инбредной линии 3629, мутантной линии *en:chlorigina-7*, полученной из исходной линии с помощью индуцированного мутагенеза, и ревертантной линии *r-en: chlorine-7*, полученной из линии *en:chlorina-7* с помощью мутагенеза. Методом высокопроизводительного параллельного секвенирования были полученные данные о полной нуклеотидной последовательности хлоропластной и митохондриальной ДНК объектов исследования.

Митохондриальные геномы всех образцов оказались идентичными, что исключает влияние митохондриальной ДНК на мутантный фенотип. Хлоропластный геном мутантной линии *en:chlorigina-7* по сравнению с геномом линии 3629 не имел крупных перестроек и содержал только однонуклеотидные замены. Всего выявлено 7 полиморфных сайтов. Интересно отметить, что все представленные полиморфные локусы были найдены в гетероплазмическом состоянии с соотношением 3:2 мутантных и диких копий хлоропластной ДНК. Одна мутация имела межгенную локализацию - *rps12-clpP*, остальные 6 SNP относились к кодирующей ДНК. В генах *rpoA*, *rps11*, *ycf1* замены оказались синонимичными. Были установлены несинонимичные замены в генах: *rpoB* (Ser138Leu), *psaA* (Thr528Ile), *psbB* (His157Tyr). Хлоропластные геномы у исходной линии 3629 и ревертантной линии *r-en: chlorine-7* оказались идентичными.

Мутантный фенотип *en:chlorina-7* связан с изменениями в генах *rpoB*, *psaA*, *psbB*, однако вклад каждого из мутантных белков пока не установлен и является дальнейшей целью нашей работы. Гены *psaA*, *psbB* кодируют белки, необходимые для функционирования фотосистемы I и фотосистемы II, поэтому можно предположить, что дефектные белки способны привести к неправильной работе реакционных центров ФС и светособирающих комплексов, что скажется на содержании хлорофиллов. Менее вероятным кажется вклад в хлорофилл-дефицитный фенотип мутации в гене β -субъединицы РНК полимеразы – *rpoB*.

Таким образом, в геноме хлорофильного мутанта подсолнечника с внеядерным типом наследования были локализованы мутации, приводящие к несинонимичным заменам в генах *rpoB*, *psaA*, *psbB*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 15-34-50294\15.

**Культивирование каллуса *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. и
Eleuterococcus senticosus Maxim. in vitro**
**Марамохин Эдуард Владимирович, Зонтиков Дмитрий Николаевич,
Малахова Ксения Вячеславовна**

ФГБУ ВПО «Костромской государственный университет имени Н.А. Некрасова»,
Россия, Кострома
maramokhin91@mail.ru

Изучение каллусных тканей в практической биотехнологии занимает одно из ведущих мест по непосредственному получению биологически активных веществ, а также по использованию каллусных тканей в получении микропобегов путем индукции структурного морфогенеза и, в частности, гомогенеза. Однако у многих растений из семейства *Schizandraceae* и семейства *Araliaceae* удалось добиться только образования каллуса, но не удалось вызвать образование из этих тканей микропобегов. Целью текущей работы является изучение анатомической и морфологической структуры тканей каллуса, полученных из разных частей изучаемых растений в культуре in vitro.

В качестве донорных эксплантов были использованы микропобеги, часть листовой пластинки и междоулье. Стерилизацию растительного материала проводили в 70° этаноле и 3% растворе гипохлорита натрия. Для индукции каллусогенеза использовали питательную среду QL с добавлением БАП 1 мг/л для лимонника и среду MS с добавлением ТДЗ 0,5 мг/л для элеутерококка.

У лимонника получены три типа каллусных тканей из разных частей растения, отличающихся по окраске, рыхлости, морфогенности; у элеутерококка – один тип. Оценка их сформированности производили на 30-35 день культивирования. Каллус растения варьирует в зависимости от тканевых структур, из которых он был получен. Каллусообразование у лимонника удалось индуцировать и на безгормональных средах, на которых он имел слабое развитие, получить его удавалось только из среза микропобега. Листовой и междоузловой каллусогенез на средах, не содержащих регуляторы роста, индуцировать не удалось. У элеутерококка только с использованием приведенных выше цитокининов удалось индуцировать малодифференцированный, быстро погибающий каллус.

Нам удалось наблюдать додифференцировку тканей у лимонника китайского: возможность получения микропобегов из каллусной ткани структурным гомогенезом. Перспективной оказалась ткань из междоузлия лимонника китайского, где наблюдалось формирование жизнеспособной микропочки. Гомогенез наблюдался и из каллуса листовой пластинки лимонника. Гомогенез у тканей части микропобега индуцировать не удалось.

**Клонирование АТФазы Р-типа морской микроводоросли *Dunaliella maritima*
Маталин Д.А.¹, Храмов Д.Е.², Шувалов А.В.¹**

¹Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва

²МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

dmatalin@mail.ru

Микроводоросли, обитающие в соленых средах, поддерживают низкие внутриклеточные концентрации Na^+ за счет функционирования в плазматических мембранах (ПМ) Na^+ -транспортирующих АТФаз Р-типа. Для некоторых морских

водорослей (*Heterosigma akashiwo*, *Porphyra yezoensis*) было показано наличие Na^+ -АТФаз, схожих с Na^+ , K^+ -АТФазами животных клеток. Для морской микроводоросли *Dunaliella maritima* функционирование Na^+ -АТФазы Р-типа было убедительно продемонстрировано в экспериментах на выделенных везикулах ПМ. Была поставлена задача клонировать Na^+ -АТФазу из *D.maritima* с целью дальнейших исследований по экспрессии и функциональной активности этого фермента. На основе двух наиболее консервативных аминокислотных мотивов АТФаз Р-типа - DKTGTLT и TGDGVND, были созданы вырожденные нуклеотидные последовательности-праймеры, которые были использованы для поиска Na^+ -АТФазы *D.maritima* методом полимеразной цепной реакции. С использованием подобранных праймеров, на матрице тотальной РНК из *D.maritima* методом ОТ-ПЦР был амплифицирован фрагмент ДНК размером около 800 нуклеотидов. Секвенирование показало, что полученный фрагмент идентичен срединному фрагменту H^+ -АТФазы плазматической мембраны экстремально галотолерантной микроводоросли *D. salina* (ABV88698.1).

Проведенный параллельно анализ пяти транскриптомов родственного солеустойчивого вида *D. tertiolecta* не обнаружил у этой микроводоросли АТФаз, которые можно было бы однозначно отнести к группе Na^+ -АТФаз. Вместе с тем, были обнаружены последовательности, содержащие ORF АТФаз, относящихся к различным группам АТФаз Р-типа: IB (переносчики тяжелых металлов), IIA (Ca^{2+} -АТФазы), IIIA (H^+ -АТФазы), IV (флиппазы), V (катион-транспортирующие АТФазы с неопределенной специфичностью). Две найденные *in silico* H^+ -АТФазы *D.tertiolecta* (HA1Dte и HA2Dte) существенно различаются по аминокислотной последовательности: HA1Dte (1131 а.о.) схожа с известными и функционально изученными H^+ -АТФазами высших растений, а HA2Dte (923 а.о.) схожа с функционально не изученной H^+ -АТФазой из экстремально галотолерантной водоросли *D. salina* (ABV88698.1). Мы предположили, что из двух H^+ -АТФаз, транскрипты которых найдены в транскриптоме *D.tertiolecta*, один фермент (HA1Dte) переносит протоны, тогда как другой (HA2Dte), возможно, не является H^+ -АТФазой, а переносит ионы Na^+ . Следует отметить, что клонированный ранее фрагмент АТФазы *D.maritima* также идентичен и срединному фрагменту HA2Dte.

Для проверки гипотезы была поставлена задача клонировать АТФазу из *D.maritima*, гомологичную HA2Dte, с целью дальнейших исследований по экспрессии и функциональной активности этого транспортного фермента. Исходя из схожести нуклеотидных последовательностей АТФаз *D.maritima*, *D.tertiolecta* и *D. salina*, на основании известных последовательностей последних двух видов были подобраны праймеры для амплификации кДНК (~2900 п.н.) содержащей ORF HA2 *D.maritima*. С этими праймерами была амплифицирована последовательность ~2900 п.н., которая была клонирована в векторе pYES2 для последующего функционального анализа. На основании полученной последовательности HA2 *D.maritima* были подобраны праймеры для экспериментов по оценке уровня экспрессии этого гена при разных условиях засоления методом ПЦР в реальном времени.

Исследование поддержано РФФИ, гранты № 13-04-01098, №16-04-01544.

Сравнительный анализ физиологического состояния прутняка простертого и терескена серого при произрастании в аридных условиях Калмыкии

Мечирова З.С., Бамбышева О.Н., Дорджиева В.О.

Калмыцкий госуниверситет, Россия, Элиста

voloshina_tv@kalmsu.ru

Территория Калмыкии относится к аридной зоне. В результате действия неблагоприятных факторов дикорастущие и особенно культурные растения сравнительно редко реализуют свой генетический потенциал, что проявляется в снижении урожайности. В связи с этим, во флоре Калмыкии широко представлены C₄- растения, у которых появившиеся в ходе адаптивной эволюции высших растений другие типы фотосинтеза, позволяют усваивать углекислый газ в экстремальных условиях (высокая температура, водный дефицит и др.) и делают фотосинтез C₄- растений в данных условиях более продуктивным. Такими растениями являются прутняк простертый (*Kochia prostrata* L.) и терескен серый (*Krascheninnikovia ceratoides* L.), которые относятся к многочисленному семейству Маревых (*Chenopodiaceae*) и являются важными кормовыми растениями. Это засухоустойчивые, успешно переносящие обезвоживание и экстремальные температуры культуры, служащие надежным резервом пастбищного корма.

Проведено изучение в течение вегетации таких показателей водного режима как общая оводненность, интенсивность транспирации, водоудерживающая способность. Проанализированы в онтогенезе ростовые параметры (высота, количество побегов) и показатели продуктивности (накопление фитомассы в сыром и сухом состоянии). Проведенное исследование показало, что данные культуры имели довольно высокий для ксерофитов уровень оводненности листового аппарата, который снижался только к фазе образования семян и высокую водоудерживающую способность. Отмечена более высокая интенсивность транспирации прутняка простертого по сравнению с терескеном серым, что, очевидно, связано в том числе и с обильной опушенностью последнего, сокращающей испарение. Изучение ростовых процессов позволило обнаружить большую высокорослость у прутняка, имеющего также большее количество побегов, что позволило ему сформировать большую сырую и сухую фитомассу при произрастании в центральной зоне Калмыкии. Проведенный анализ растений семейства Маревых показал, что их урожайность во многом коррелирует с состоянием водного режима, ростовых процессов, показателями которых являются высота растений, густота травостоя, характер облиственности, количество побегов на одном растении.

Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. Т.В. Волошиной за помощь в подготовке тезисов.

Влияние мутации гена анионного канала тилакоидной мембраны CLC_e на фотохимическую активность *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Неделяева Ольга Игоревна

Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва

olga.nedelyaeva@yandex.ru

Семейство CLC-белков включает Cl⁻-каналы и анион/протонные антипортеры. В клетках *Arabidopsis thaliana* обнаружено семь генов этого семейства, CLC_{a-e}, продукты которых локализованы в разных внутриклеточных мембранах. Одним из белков семейства

CLC, функции и физиологическая роль которых наименее изучена, является белок тилакоидной мембраны AtCLC_e.

В настоящей работе исследовали фотохимическую активность растений гомозиготной линии мутанта *clce Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и растений дикого типа (ДТ) экотипа Col-0 путем регистрации параметров флуоресценции хлорофилла с помощью импульсного флуориметра Dual-PAM-100. Отбор семян гомозиготной линии был осуществлен методом ПЦР. Растения выращивали в почве в факторостатной камере при температуре 23°C и фотопериоде 16 час. Перед измерениями растения в течение 30 мин выдерживали в темноте.

У мутанта и дикого типа мало различались значения максимального квантового выхода флуоресценции хлорофилла (Fv/Fm), коэффициента фотохимического тушения флуоресценции (qP), эффективного квантового выхода разделения зарядов во второй фотосистеме, Y(II), и скорости транспорта электронов через ФСII, ETR(II). Нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) и квантовый выход регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции, Y(NPQ), отражающие энергозависимую тепловую диссипацию энергии возбужденного хлорофилла, у мутанта имели тенденцию к увеличению. Коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции (qN) у мутанта был выше, а квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции, Y(NO), - ниже, чем у растений ДТ.

Мутация *clce* должна приводить к снижению анионной проводимости тилакоидной мембраны и, соответственно, к возрастанию электрической составляющей градиента электрохимического потенциала H⁺ (Δψ). Можно предположить, что возрастание Δψ, наряду с ΔpH, активирует механизм регулируемой энергозависимой диссипации тепловой энергии Y(NPQ). Активирование этого механизма у мутанта, по-видимому, обеспечивает эффективное функционирование ЭТЦ хлоропластов.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-04712а и 16-34-00991мол_а.

**Анализ влияния регуляторов роста различной природы
на развитие льна культурного
Орлов Владимир Владимирович**

*Тверской государственной технической университет, Россия, Тверь
common@tstu.tver.ru*

Лен культурный (*Linum usitatissimum*) широко возделывается во многих регионах России. Особый интерес представляют семена льна, обладающие большой пищевой ценностью, а также льняное волокно, являющееся экологически чистым сырьем для производства высококачественных тканей. В связи с этим, большое внимание приковано к проблеме повышения урожайности льна культурного, которую возможно решить с применением различных регуляторов роста растений. Использование современных регуляторов роста растений, обладающих разносторонним спектром действия, способствует повышению устойчивости растений к перепадам температур, избытку и недостатку воды. Следовательно, в настоящее время актуален подход к применению комплексных регуляторов роста в современных технологиях выращивания сельскохозяйственных растений. Данный прием приобретает особую значимость при производстве экологически чистой продукции без применения агрессивных химических реагентов.

В представленной работе на примере нескольких сортов льна масличного и льна-долгунца исследовано влияние регуляторов роста растений различной природы (раствор Кнопа, коммерческое бактериальное удобрение, а также водные и спиртовые экстракты *Picea abies* в различных концентрациях) на ранние этапы развития *Linum usitatissimum* при различных температурных и световых режимах. В качестве контрольного эксперимента был проведен опыт без стимуляторов роста. В качестве материала для проведения исследования использованы семена сортов льна, различающихся по морфотипу, а также по месту и времени создания сорта. Семена получены в одних условиях выращивания на экспериментальных полях ГНУ ВНИИ льна (г. Торжок, Тверская обл.).

Вегетационные опыты проводили с использованием чашек Петри, а также на песчаных почвах, в которых чистый речной песок предварительно просеивали через сита с диаметрами ячеек 0,5 мм, промывали последовательно водопроводной и дистиллированной водой, просушивали и использовали для набивки сосудов. Дозировки внесения всех регуляторов роста рассчитывали либо по действующему веществу, либо по количеству микроорганизмов (для биоудобрения, содержащего азотфиксирующие микроорганизмы).

Эффективность исследуемых стимуляторов оценивали по скорости появления зародышевых корней и побегов, по приросту биомассы, а также по повышению устойчивости семян к пониженным температурам. Выявлено, что семена льна масличного и льна-долгунца по-разному реагируют на внесения дополнительных источников азота. По результатам экспериментов установлено, что бактериальное удобрение оказывает наиболее выявленный положительный эффект при использовании на песчаной культуре, а раствор Кнопа – при предварительном замачивании семян в чашках Петри.

Влияние гаметофитных мутаций на пролиферацию ядер в женском гаметофите *Nicotiana tabacum* L.

Парфирова Ирина Владимировна

*Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,
Россия, Саратов
emi-world@yandex.ru*

Познание особенностей генетической регуляции систем размножения растений является одним из фундаментальных направлений современной биологии. Женский гаметофит или зародышевый мешок (ЗМ) является ключевым элементом системы размножения, в котором происходят процессы оплодотворения и развития зародыша и эндосперма. Однако лишь единичные работы посвящены генетическому исследованию женского гаметофита. Цель настоящей работы состояла в изучении фенотипической изменчивости ЗМ двух мутантных линий табака: М-2 и М-3. Препараты для анализа ЗМ готовились с использованием метода ферментативной мацерации семязачатков до клеточной суспензии.

У контрольной линии БГ-6 развитие 98,2 % ЗМ осуществлялось нормально и заканчивалось образованием 8-ядерного, 7-клеточного, биполярного гаметофита. У 8 проанализированных растений мутантной линии М-3 количество аномальных ЗМ варьировало от 83 до 93 %. Среди них преобладали ценоцитные 2-4-ядерные, количество которых от общего числа аномалий составило в среднем 55,6 %. Вторым по встречаемости классом были клеточные малоядерные ЗМ. ЗМ с числом ядер равным 8 и

более встречались с частотой, не превышающей 2 %. От 40,2 до 61,5 % аномальных ЗМ содержали увеличенные ядра с дополнительными ядрышками. Появление таких ядер указывает на нарушения при прохождении митозов или на замену митотических делений эндомитозами. Следовательно, в ЗМ мутанта М-3 возможно появления ядер разного уровня плоидности и с разным числом хромосом. У мутантной линии М-2 было исследовано 4 растения. Количество аномальных ЗМ в среднем составило 39,5 %, большая часть которых (89,3 %) представлена многоядерными клеточными ЗМ. Это были биполярные ЗМ с числом ядер от 9 до 16. Важной особенностью таких ЗМ было увеличение числа клеток в яйцевом аппарате, морфологически сходных с яйцеклеткой, и числа полярных ядер.

Таким образом, изученные линии являются носителями различных гаметофитных мутаций, участвующих в контроле пролиферации ядер ЗМ табака. При этом мутация у растений М-3 является негативным регулятором пролиферации клеток, а мутация у растений М-2 – позитивным. Плейотропный эффект мутаций проявляется в их влиянии на другие признаки ЗМ: полярность, дифференцировку клеток, процессы цитокинеза.

Исследование накопления белка в побегах и корнях льна культурного на ранних этапах развития при контролируемых условиях азотного питания

М.С. Барсукова, А.В. Сергеева, Р.Н. Тарасова

Тверской государственный технический университет,

химико-технологический факультет, Россия, Тверь

regina.tarasova94@mail.ru

Азот является важным биологическим элементом и играет исключительную роль в жизни растений, следовательно, ему принадлежит ведущая роль в повышении урожаев сельскохозяйственных культур. В современном сельском хозяйстве основной источник азота для растений - промышленное внесение аммонийных и нитратных удобрений. Современные азотные удобрения позволяют существенно повысить уровень продуктивности земледелия, однако при нарушении технологии их применения они могут оказать существенное негативное воздействие на биосферу - почву, воду, атмосферу, растения, а через них - на животных и человека. Следовательно, совершенствование техник и дозировок рационального внесения азотных удобрений позволит не только добиться положительного влияния на урожайность сельскохозяйственных растений, но и снизить загрязнение природной среды минеральными удобрениями.

В представленной работе на примере нескольких сортов льна масличного и льна-долгунца исследовано накопление белка в побегах и корнях в контролируемых условиях азотного питания. В качестве материала для проведенного исследования были изучены семена 10-ти сортов льна, различающихся по морфотипу, а также по месту и времени создания сорта: а) масличный лен – Воронежский, Норлин, желтый-ЛМ-98, коричневый ЛМ и б) лен-долгунец – Альфа, Ленок, Росинка, Регина, Фландерс, Новоторжский. Семена получены в одних условиях выращивания на экспериментальных полях ГНУ ВНИИ льна (г. Торжок, Тверская обл.).

В качестве контрольного эксперимента проведены серии опытов без дополнительного внесения компонентов, влияющих на азотное питание растений. Вегетационные опыты по выращиванию льна проводили на песчаных культурах при контролируемой температуре и влажности. Перед посевом семенами проверяли на

всхожесть, которая составила 98-100% в зависимости от исследуемого сорта. Контролируемые условия азотного питания обеспечивались путем использования раствора Кнопа и его модификаций, а также коммерческого бактериального удобрения, содержащего азотфиксирующие микроорганизмы.

В каждой серии экспериментов для полученных растений определяли массу надземной и подземной части, а также содержание белковых компонентов в побегах и корнях. Концентрацию белков определяли бицинхонатным и биуретовым методами. Количество белка различно у изученных сортов (амплитуда различий превышает двукратное значение) и зависит от используемого источника азотного питания, а также от температуры опыта. Использование компонентов, обеспечивающих контролируемые условия азотного питания, во всех сериях экспериментов положительно влияло на рост растений.

**Количество и жирнокислотный состав суммарных липидов микроводоросли
Issyk Green из коллекции IPPAS**

**Терентьева Мария Сергеевна¹, Сидоров Роман Александрович²,
Синетова Мария Андреевна²**

¹*Северный Арктический Федеральный Университет имени М. В. Ломоносова,
Россия, Архангельск*

²*Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН, Россия, Москва,
rasterashka1994@yandex.ru, ras@ippras.ru*

В настоящее время микроводоросли (МВ) всё чаще рассматриваются как источник жирного масла и жирных кислот (ЖК), в том числе полиненасыщенных (ПНЖК), в пищевых и технических целях (например, для синтеза CO₂-нейтрального биотоплива). Одной из наиболее актуальных задач для исследователей МВ является скрининг как можно большего количества различных видов МВ для установления их биотехнологического потенциала. Нами проведена морфофизиологическая характеристика микроводоросли Issyk green, выделенной из озера Иссык (Казахстан). Были установлены оптимальные условия культивирования данного штамма, определены морфологические особенности клеток с помощью электронной микроскопии, количество и ЖК-состав их суммарных липидов (СЛ) с помощью ГЖХ-МС, на разных стадиях культивирования: в условиях хранения (стадия I), стадии экспоненциального роста (стадия II) и стационарной стадии (стадия III). Было установлено, что исследуемая водоросль в культуре на жидкой среде BG-11 имеет сравнительно небольшое время удвоения – 8,5 часов, что делает возможным её культивирование в биореакторах. Наиболее интенсивный рост наблюдается первые 100 часов культивирования, а к 160 часу культура выходила на плато. При переходе от стадии II к стадии III, клетки наращивали мощную клеточную стенку, а также появлялись крупные включения, похожие на вакуоли, в которых, предположительно, накапливается глицерин, как это было показано ранее для некоторых галотолерантных видов МВ из родов *Dunaliella* и *Asteromonas*. В СЛ этой МВ было обнаружено 13 индивидуальных ЖК, главными из которых на всех этапах культивирования были пальмитиновая, гексадекадиеновая ($\Delta 7,10-16:2$), гексадекатриеновая ($\Delta 7,10,13-16:3$), стеариновая, олеиновая, линолевая и α -линоленовая. Высокое относительное содержание $\Delta 7,10-16:2$ и $\Delta 7,10,13-16:3$ (11,4 и 15,7% от суммы ЖК на стадии II) может указывать на то, что синтез линолевой и α -линоленовой кислот у

данного вида МВ может протекать как посредством C_2 -удлинения ненасыщенных C_{16} -ЖК, так и за счёт последовательной $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\Delta 15$ -десатурации стеариновой кислоты. Наибольшее количество липидов ($\approx 13\%$ от сухого веса) и максимальный уровень их ненасыщенности имели место на стадии II. С точки зрения биотехнологического потенциала, следует отметить высокое содержание ЖК (ω -3)-ряда, которые являются незаменимыми для теплокровных организмов. Так, на этапе экспоненциального роста культуры, доля этих ЖК достигала $38,4\%$, а (ω -6)-ЖК, также представляющих диетическую ценность – 32% от суммы ЖК, т.е. $>70\%$ ценных ПНЖК.

Работа поддержана Российским научным фондом (Грант 14-14-00904).

Исследование микроспорогенеза и пыльцы у тетраплоидной кукурузы

Трущелева Ольга Сергеевна, Джалилов Эльдар Хандадаш Оглы,

Магеррамов Шамиль Валехович

Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,

Россия, Саратов

vtoroe-dihanie@mail.ru

На основе структурных характеристик пыльцы можно проводить оценку генотипической, морфологической и функциональной гетерогенности пыльцы. Этот подход является обязательным и при оценке репродуктивного потенциала полиплоидных растений. В данной работе приводятся результаты исследования пыльцы у тетраплоидной формы кукурузы КрП-1, которая прошла длительный отбор на повышение фертильности.

Установлено, что количество пыльцы со структурными изменениями у разных растений варьирует от 4 до $15,2\%$. Аномальные пыльцевые зерна (ПЗ) представлены двумя основными типами: измененным числом клеточных элементов и пыльцой атипичной формы. В первой группе встречались ПЗ с незавершенным развитием (одно- и двухъядерные) и с дополнительными клеточными элементами: вегетативными ядрами и спермиями. В целом их частота составила $0,7$ - $5,5\%$. У разных растений с частотой от $0,3$ до $6,9\%$ были обнаружены ПЗ неправильной формы: удлинённые, каплевидные, гантелевидные, в отличие от округлой в норме. Таким образом, при развитии ПЗ из микроспоры происходит нарушение различных цитологических событий: числа митотических делений, поляризации клеток, клеточной дифференцировки. Считаем, что такие нарушения обусловлены появлением в ходе аномального мейоза анеуплоидных и полиплоидных микроспор. Было показано, что нарушения кариокинеза в ходе мейотических делений у разных растений встречаются с частотой от $2,8$ до $10,8\%$. Они представлены слипанием хромосом, расположением отдельных хромосом вне основных хромосомных групп, изменением ориентации веретен деления, их слиянием или образованием трехполюсных веретен деления. Частота микроспороцитов с нарушениями заложения клеточной перегородки у некоторых растений была более 50% . Нарушения цитокинеза были представлены его выпадением после первого и/или второго мейотического деления или неполным разделением дочерних клеток. Различные вариаций карио- и цитокинеза в мейозе приводили к образованию монад, триад, аномальных тетрад и полиад микроспор ($9,3$ - $25,1\%$).

Проведенное исследование показало особенности формирования ПЗ у тетраплоидной формы кукурузы КрП-1 и выявило тенденцию к отсеиванию аномальных структур в ходе микроспорогенеза и развития пыльцы. Их количество уменьшается в

ряду: мейоз, тетрадогенез, зрелая пыльца. Это свидетельствует о наличии отбора, прежде всего, клеток, не завершивших спорогенез и не образующих гамет (спермиев).

Трансгенные растения осины с экспрессией гена грибной лакказы

Тугбаева Анастасия Сергеевна

Уральский федеральный университет имени первого Президента

России Б.Н. Ельцина, Россия, Екатеринбург

anastasia.tugbaeva@gmail.com

Осина является одной из быстрорастущих древесных пород, которая широко применяется в целлюлозно-бумажной промышленности. Производство бумажной массы влечет за собой загрязнение окружающей среды токсическими лигнинами. В биодegradации лигнина участвуют грибные лакказы. Роль растительных лакказ в биосинтезе лигнина не выявлена однозначно. Древесных растений, экспрессирующих гены грибных лакказ до настоящего времени получено не было. Анализ биосинтеза лигнина, а также факторов, регулирующих этот процесс, позволит решить проблему загрязнения окружающей среды и сделает производство более рентабельным.

Цель работы – исследовать роль лакказы из гриба *Trametes hirsute* в биосинтезе лигнина и функционировании древесных растений.

В ходе агробактериальной трансформации вектором *pVI-lac* были получены трансгенные растения осины; экспрессия целевой конструкции была подтверждена методом ОТ-ПЦР в 7 клонах из 11 проанализированных. Данные растения были выращены в условиях защищенного грунта и использованы для анализа химии древесины и оценки биометрических показателей.

Анализ ферментативной активности лакказы показал ее увеличение в растениях *in vitro* у 5 линий на 26 – 120% по сравнению с нетрансгенным контролем; в растениях *ex vitro* увеличение у 4 линий на 8,86 – 44,73%. Наблюдается корреляция между повышением ферментативной активности рекомбинантной лакказы *in vitro* и *ex vitro*.

Высота растений *ex vitro* 3 линий выше контроля на 26,47%; для 4 линий высота ниже контроля на 63,43%.

Химический анализ состава древесины выявил снижение пентозанов на 8,65% для 6 линий, повышение целлюлозы на 5,88 – 25,29% для 6 линий, снижение общего лигнина на 8,22 – 13,8% для 4 клонов осины с экспрессией целевой конструкции. Содержание лигнина Классона уменьшается на 7,17-14,23% по сравнению с нетрансгенным контролем. Соотношение показателя целлюлоза/лигнин увеличивается в 1,350 раза.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что экспрессия гена грибной лакказы способствует изменению высоты трансформантов, снижению содержания лигнинов и повышению содержания целлюлозы в древесине трансгенных растений. Полученные данные не противоречат публикациям о роли грибных лакказ в функционировании травянистых растений.

Автор выражает благодарность научным руководителям к.б.н. Ковалицкой Юлии Андреевне, к.б.н. Шестибратову Константину Александровичу (группа лесной биотехнологии, ФИБХ РАН, г. Пущино).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-08-31667.

Влияние присутствия сахарозы, а также количественного соотношения аммонийного и нитратного форм азота в составе питательной среды на ростовые и физиолого-биохимические характеристики проростков томата *in vitro*

Турба Анастасия Алексеевна

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА

имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва

anastas035@gmail.com

Ключевым фактором, влияющим на ростовые и физиолого-биохимические процессы культивируемых в условиях *in vitro* растений, является состав питательной среды. Цель настоящего исследования – изучить влияние присутствия сахарозы и количественного соотношения аммонийного и нитратного форм азота в составе питательной среды, составленной на основе прописи среды MS, на морфометрические и физиолого-биохимические характеристики проростков томата. Объектом исследования служили 10-12-дневные асептические проростки томата (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Форвард. На этапе образования 1-го настоящего листа у проростков отсекали корни и часть гипокотыля. Впоследствии фрагменты побегов переносили на агаризованные питательные среды для индукции ризогенеза, различающиеся наличием или отсутствием сахарозы, а также количественным содержанием нитрата аммония. После 15 суток культивирования проводили учет по числу и длине регенерированных корней, сырой и сухой биомассе корней и побеговой части проростка. Параллельно закладывался опыт для измерения дыхательного и фотосинтетического CO₂-газообмена укорененных проростков. Было установлено, что число регенерируемых корней у фотоавтотрофных проростков томата существенно меньше, чем у фотомиксотрофных. Высокие концентрации ионов аммония и нитрата приводили к уменьшению числа корней у фотоавтотрофных проростков томата. При отсутствии аммонийного азота в питательной среде длина корней у фотоавтотрофных проростков была в 3,5 раза больше, чем у фотомиксотрофных. Добавление катиона аммония в концентрациях 10.3 и 20.6 мМ в сочетании с 29.1, и 39.4 мМ аниона нитрата у последних приводило к постепенному увеличению их длины. Напротив, длина корней у фотоавторофных проростков томата не зависела от присутствия катиона аммония, а также количественного соотношения ионов NH₄⁺ и NO₃⁻. Наличие катиона аммония в сочетании с различными концентрациями аниона нитрата способствовало увеличению сырой биомассы регенерированных корней и побега у фотомиксотрофных проростков томата. Схожая реакция наблюдалась и в отношении сухой биомассы корней и побеговой части проростка. Показано, что у фотоавтотрофных проростков томата интенсивность истинного фотосинтеза была значительно выше, чем у фотоавтотрофных. При этом присутствие NH₄⁺, а также количественное соотношение аммонийного и нитратного форм азота не оказывало достоверного влияния на интенсивность истинного фотосинтеза у фотомиксотрофных проростков.

Оценка уровня экспрессии генов риса в условия сильного хлоридного засоления

Хачумов Владимир Артурович, Макаренко Максим Станиславович

Академии биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского
Южного федерального университета, Россия, Ростов-на-Дону
rost1993ov@gmail.com

Изучение солевого стресса является важной как фундаментальной, так и прикладной задачей. Хлоридное засоление затрагивает целый каскад реакций в организме растения. Целью работы является оценка уровня экспрессии генов различных линий риса (*Oryza sativa*) при сильном хлоридном засолении.

Материалом исследования послужили линии риса (*Oryza sativa*): Pokkali, Остап, Боярин. Было проведено исследование уровня экспрессии генов *hkt4* и *hkt8* в различных тканях растений, при условиях сильного хлоридного засоления (1,2 % раствор NaCl). В качестве референсных генов использованы гены *actb* и *ubq6*. Контрольные растения выращены на дистиллированной воде.

По результатам физиологических испытаний растения разделили на две группы: устойчивые (выживаемость >80%) и неустойчивые (выживаемость <80%). Устойчивой оказалась линия Остап, а неустойчивыми – линии Боярин и Pokkali. Интересно отметить, что линия Pokkali, по литературным данным, является устойчивой к хлоридному засолению (0,5 % раствор NaCl), однако в условиях сильного засоления (1,2 % – NaCl) растения линии Pokkali оказались неустойчивыми. При хлоридном засолении у всех объектов исследования была снижена экспрессия гена *hkt4* в стеблях относительно контроля в 6-12 раз. Также у неустойчивых линий снизилась экспрессия гена *hkt4* в корне в 4,3-5,3 раз, однако у линии Остап экспрессия *hkt4* в корне при воздействии соли была выше в 0,78 раз. Уровень экспрессии *hkt4* в корне у линии Остап в 5,4 раза превысил показатели линии Pokkali и в 6,8 раз линии Боярин. Экспрессия гена *hkt8* снизилась во всех растениях в 7,6 раз и более, особенно в тканях корня (в 9,5 раз и более). Однако у линии Остап наблюдалась повышенная экспрессия гена *hkt8* в корне по сравнению с неустойчивыми линиями: в 3,5 раза выше, чем у линии Pokkali, и более чем в 10 раз выше, чем у линии Боярин.

Таким образом, ген *hkt4* играет важную роль в системе защиты растений устойчивых к хлоридному засолению. Полученные результаты свидетельствуют о вкладе гена *hkt4* в устойчивость к 1,2 % хлоридному засолению. Экспрессия гена *hkt4* в корне коррелирует с фенотипической устойчивостью растения к хлоридному засолению.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, проект № 40.91.2014/К.

О содержании различных классов фенольных соединений в листьях молодых флешей растений чая (*Camellia sinensis* L.) сорта «Колхида»

Чистяков Ф.Е.¹, Лапшин П.В.², Назаренко Л.В.¹

¹ГАОУ ВО «Московский городской педагогический университет», Россия, Москва

²ФГБУН Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва
fedduk@yandex.ru, p.lapshin@mail.ru

Растения чая (*Camellia sinensis* L.) представляют собой уникальную субтропическую культуру, молодые побеги (3-листные флешки) которой используются для

промышленного получения традиционного во всем мире продукта – чая. Качество чая определяется составом и содержанием фенольных соединений (ФС), в том числе флаванов (ФЛ) – веществ, которые обладают Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью. Биосинтетическая способность растений чая зависит от сортовых характеристик, стадий онтогенеза и условий произрастания. Ранее было показано, что для сорта «Колхида» характерна высокая способность к накоплению ФС, которая исследовалась преимущественно для растений чая, выращиваемых в Грузии и крайне мало – для других мест произрастания.

Целью работы являлось изучение содержания ФС и ФЛ в листьях молодых флешей чая сорта «Колхида», произрастающих в районе Большого Сочи (пос. Уч-Дере, ЗАО «Дагомысчай»).

Объектом исследований являлись листья молодых флешей чая, собранные в различные фазы их онтогенеза, начиная с 3 мая по 10 июля 2014 г. Экстракцию ФС проводили 96%-ным этанолом или горячей водой из измельченного растительного материала. В экстрактах определяли суммарное содержание ФС (с реактивом Фолина-Дениса) и содержание ФЛ (с ванилиновым реактивом). Калибровочные кривые в обоих случаях строили по (-)-эпикатехину.

Суммарное содержание ФС, экстрагируемых из листьев этанолом, было самым низким в начале их роста, затем оно повышалось, достигая максимума во взрослых листьях. Аналогичная тенденция характерна и ФЛ. Различия в содержании этанол-экстрагируемых ФС и ФЛ между молодыми и взрослыми листьями составляли, соответственно, 200% и 300%.

Содержание водорастворимых ФС было практически одинаковым на всех этапах онтогенеза молодых листьев, тогда как содержание ФЛ постепенно повышалось по мере их формирования, достигая наибольших значений во взрослых листьях. Следует отметить, что в большинстве случаев количество ФС и ФЛ в водных экстрактах было выше, чем в этанольных экстрактах, что предполагает возможность использования различных экстрагентов для их извлечения из листьев чая.

Влияние прайминга ЭМИ на состав жирных кислот в семенах лекарственных растений

Ший Светлана Николаевна

*ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Беларусь, Минск
svetlana.shysh@gmail.com*

В связи с возросшим интересом исследователей к изучению слабых физических воздействий на живые объекты и показанными эффектами стимуляции и угнетения в зависимости от дозы облучения изучено влияние прайминга семян электромагнитного излучения (ЭМИ) на состав жирных кислот (ЖК) в семенах лекарственных растений *Calendula officinalis* L. и *Nigella sativa* L.

Анализ масла из семян проводили с помощью метода ЯМР-спектроскопии и корреляционной спектроскопии.

Прайминг семян ЭМИ приводит к изменению состава ЖК в семенах *C. officinalis* сразу после воздействия. Количественный анализ показал, что в масле необработанных семян *C. officinalis* содержится: 52,6 % – календовой кислоты, 24,6% – линолевой кислоты, 17,5 % – насыщенных кислот, 2,1 % и 1,4% – конъюгированных ЖК неуставленной

структуры. В результате прайминга происходит увеличение количества ненасыщенных ЖК (НЖК). Отмечено, что величина отклика зависит от экспозиции воздействия, максимальна при 12 минутной обработке в диапазоне 64-66 ГГц и повышает степень ненасыщенности на 5 %.

Показано, что у *N. sativa* изменяется не только состав ЖК, но и в последующем в процессе созревания новых семян меняется строение триглицеридов. В масле *N. sativa* присутствуют: линолевая кислота (55,4%), олеиновая (13,6%) (преимущественно в центральном положении триацилглицеридов), эйкозодиеновая (3,8 %), насыщенные кислоты (около 21,4 %), тимохинон (0,6 %) и пара-цимол (2,3 %). Воздействие ЭМИ приводит к увеличению НЖК и уменьшению содержания тимохинона в масле *N. sativa*. Максимальные изменения отмечены при экспозиции 20 мин в диапазоне 53 -78 ГГц.

Таким образом, прайминг семян ЭМИ приводит к количественным и качественным изменениям в составе ЖК изучаемых растений, выражаясь в увеличении НЖК, что может представлять собой неспецифическую адаптивную реакцию растений на ЭМИ КВЧ диапазона. Причем данная реакция отмечена как для семян, непосредственно подвергшихся воздействию, так и для семян, полученных в результате выращивания обработанных ранее растений.

Патологии митоза у кедрового стланика в культуре тканей *in vitro*

Шуваев Денис Николаевич

*Институт леса имени В.Н. Сукачева СО РАН, Россия, Красноярск
shuvaev.denis@yandex.ru*

Существующие технологии регенерации хвойных через соматический эмбриогенез обходят стороной такую проблему, как соматическая изменчивость эмбрионных клеточных линий. Опубликовано множество работ, посвященных данной проблеме у покрытосеменных, но в области культуры тканей хвойных аналогичных работ почти нет, а для кедрового стланика они отсутствуют.

Материалом для исследования послужили 4 эмбрионные клеточные линии кедрового стланика, выращиваемые на различных питательных средах. Чтобы оценить уровень соматической изменчивости данных линий, был использован модифицированный сквош-метод приготовления давленных препаратов хромосом.

Исследование эмбрионных клеточных линий 21.4, 21.11, 21.12 и 22.9 на питательной среде для пролиферации 1/2LV₂ показало, что среди них существует большая вариабельность относительно встречающихся форм патологий митоза. В эмбрионной клеточной линии 21.4 было отмечено 7 разновидностей патологии митоза, кроме того, в культурах данной клеточной линии процент патологических митозов был самым высоким и составлял 28,77%. Клеточная линия 21.12 имела наиболее низкий процент аномалий, который составил 11,11%. Среди форм патологий митоза данной клеточной линии были отмечены только фрагментация хромосом и формирование микроядер. Эмбрионные клеточные линии 21.11 и 22.9 характеризовались примерно одинаковыми значениями частоты патологических митозов. Для клеточной линии 22.9 частота аномалий составляла 16,39% и характерным явлением было формирование хромосомных мостов, как одиночных, так и двойных. В линии 21.11 частота патологических митозов составила 16,13%, хромосомных мостов обнаружено не было, но была значительна доля патологий митоза, связанных с набуханием и склеиванием хромосом. Наиболее характерным

явлением, которое встречалось у всех эмбрионных клеточных линий, было формирование микроядер.

Таким образом, на основании критерия «процент патологических митозов» был установлен уровень соматональных нарушений для каждой эмбрионной клеточной линии. Линии различались как по проценту патологических митозов, так и по преобладанию форм патологий. Предполагается наличие обратной корреляционной зависимости между процентом патологических митозов и продуктивностью клеточных линий. Полученную информацию можно использовать для отбора наиболее "здоровых" эмбрионных клеточных линий.

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Влияние тромбина на выживаемость астроцитов в культуре при ишемии

Абрамов Е.А

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

nuler578@rambler.ru

Основными факторами, вызывающими гибель клеток при ишемии мозга, являются недостаток глюкозы и кислорода. Астроциты – основные клетки, обеспечивающие жизнедеятельность нейронов мозга и быстро реагирующие изменением метаболизма на ишемию. При такой патологии повышается проницаемость гемато-энцефалического барьера и в мозговой ткани появляется тромбин, который участвует не только в реакциях свёртывания крови, но и в регуляции клеточных функций.

Эксперименты были выполнены на культуре астроцитов, выделенных из кортекса новорождённых крысят. Уровень живых клеток оценивали с помощью МТТ-теста, а уровень некроза – по высвобождению лактатдегидрогеназы (LDH). Моделирование ишемии-реперфузии осуществляли помещением клеток в среде без глюкозы в инкубатор (5%O₂, 5%CO₂) на 5 часов с последующим возвращением к нормальным условиям (21%O₂ и наличие глюкозы).

Пятичасовая ишемия приводила к повышению доли некротических клеток на 21% непосредственно после воздействия и на 18% через 24 часа после реперфузии по сравнению с контролем. Предобработка астроцитов тромбином (10нМ) повышала выживаемость клеток в условиях ишемии. Анализ выживаемости МТТ-методом показал достоверное увеличение доли живых клеток после реперфузии в присутствии тромбина на 16±3,4% и 16±3,3%, через 12 и 24 часа соответственно, по отношению к ишемическому воздействию в отсутствие тромбина. При этом тромбин при ишемии достоверно снижал уровень некроза по сравнению с группой без тромбина через 1 час и 12 часов на 12% и 14,6%, соответственно. Причем доля некроза при добавлении тромбина в условиях ишемии через 1 час достоверно не изменялась, а через 24 часа наблюдалось снижение данного показателя на 9% по отношению к контрольной группе (21%O₂ и наличие глюкозы).

Таким образом, тромбин в концентрации 10 нМ оказывает протекторное действие на астроциты в условиях ишемии, что согласуется с ранее полученными в нашей лаборатории данными о протекторном действии тромбина в низких концентрациях на нейроны в условиях эксцитотоксичности. Итак, снижение концентрации тромбина приводит к смене нейротоксического эффекта протеазы на защитный, что может быть связано с изменением характера активации его рецептора и требует дальнейшего исследования.

Изменение параметров микроциркуляции под воздействием дозированной физической нагрузки у детей младшего школьного возраста

Бабошина Н.В.

*Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д.Ушинского,
естественно-географический факультет, Россия, Ярославль
pankrateva@bk.ru*

Цель. Выявить изменения параметров микроциркуляции под воздействием дозированной мышечной нагрузки у детей младшего школьного возраста.

Материалы и методы. В исследование были включены дети в возрасте 10 лет: 32 девочки и 29 мальчиков. Методом лазерной доплеровской флоуметрии оценивали кожный кровоток, с помощью вейвлет-анализа рассчитывали характеристики различных регуляторных механизмов микроциркуляции до и после дозированной физической нагрузки (10 приседаний в среднем темпе).

Результаты исследования. У мальчиков и девочек в покое показатель микроциркуляции достоверно не отличался. У мальчиков максимальная амплитуда эндотелиальных ритмов была ниже (на 31%, $p<0,01$), а нормированная – выше на 17% ($p<0,05$) в сравнении с данными группы девочек. При сравнении значений микрососудистого тонуса выявлены более низкие значения миогенного тонуса (на 13%, $p<0,05$) и показателя шунтирования (на 13%, $p<0,05$) у мальчиков.

После дозированной физической нагрузки показатель микроциркуляции в исследуемых группах достоверно не отличался. У девочек наблюдалось увеличение среднеквадратичного отклонения и вариабельности кровотока (на 26% и 24%, $p<0,01$). Максимальные амплитуды эндотелиальных, нейрогенных и миогенных ритмов были выше после нагрузки на 49%, 43% ($p<0,01$) и 33% ($p<0,001$), соответственно. В показателях микрососудистого тонуса достоверных отличий не обнаружено. В группе мальчиков после приседаний выявлено увеличение среднеквадратичного отклонения (на 20%, $p<0,05$); значения максимальных амплитуд эндотелиальных, нейрогенных, миогенных, дыхательных и сердечных ритмов увеличились после приседаний на 48%, 26%, 21%, 17%, 13% ($p<0,05$), соответственно. Показатели микрососудистого тонуса не изменились.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что у мальчиков и девочек после физической нагрузки изменения на уровне микроциркуляции вызваны разным соотношением регуляторных влияний. Отмеченное у девочек увеличение влияния активных механизмов регуляции вызывает снижение мышечного сопротивления и увеличение нутритивного кровотока. У мальчиков увеличение влияния всех регуляторных механизмов на микроциркуляцию приводит к ускорению микрокровоотока в сосудах, направленного на реализацию метаболических процессов.

Обоснование применения легочной модели заражения мышей для изучения развития пневмококковой инфекции

Барановская С.А.

*ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, Россия, Москва
sofyabaranovskaya@gmail.com*

Использование традиционной «септической» модели заражения мышей пневмококковой инфекцией сталкивается с определенными трудностями, так как не все штаммы пневмококка вызывают гибель мышей при внутрибрюшинном заражении. Поскольку *Streptococcus pneumoniae* тропен к дыхательным путям и легочной ткани, то наиболее показательным с нашей точки зрения было бы определение данного возбудителя именно в тканях легких. Цель работы - изучить возможность применения легочной модели заражения мышей для изучения пневмококковой инфекции.

В работе использовали беспородных интактных белых мышей (n=120), которых интраназально заражали культурой *S. pneumoniae*, относящейся к 9N серотипу в дозе 10^7 микробных клеток (м.к.). Через 3 часа после заражения, далее ежедневно в течение 10 суток и на 20 сутки после заражения вскрывали по 10 мышей, у каждой брали легкие, стерильно отобранный материал гомогенизировали, мерно высевали на чашки Петри и через 18-20 часов производили подсчет выросших колоний бактерий *S. pneumoniae* и пересчет количества бактерий на одну мышшь.

Через 3 часа после заражения среднее число бактерий на 1 мышшь составляло 740 ± 40 м.к. Через 2 суток в легких определялось максимальное количество 6×10^6 м.к., которое на 3 сутки снижалось до минимального и составляло в среднем 6×10^4 м.к. Далее количество бактерий опять возрастало и на 8-10 сутки держалось на уровне 1×10^6 м.к. К 20 дню наблюдения происходила элиминация возбудителя из легких мышей и в среднем на мышшь определялось 73 м.к. На протяжении опыта случаев гибели мышей зафиксировано не было. Полученные данные свидетельствуют о развитии пневмококковой инфекции у мышей. Таким образом, мы показали возможность применения вышеописанной модели.

Полученные результаты позволили проанализировать количественную динамику экспериментального развития пневмококковой инфекции у мышей, а также сроки элиминации возбудителя из легких мышей. На основе полученных данных показано, что легочная модель может быть использована для изучения процесса развития пневмококковой инфекции у мышей. В дальнейшем, на наш взгляд, легочная модель может быть применена при изучении иммуногенности препаратов для профилактики пневмококковой инфекции.

Активация PAR-1 рецепторов вызывает увеличение размера кванта ацетилхолина в зрелых моторных синапсах мыши

Белоусова Юлия Владимировна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва
dzhulia.belousova@yandex.ru*

PAR (Proteinase-Activated Receptor) – семейство G-белок сцепленных метаботропных рецепторов, активируемых как протеиназами гемостаза (тромбином, трипсином и др.), так и синтетическими пептидами - PAR-агонистами. Использование PAR-агонистов выявило присутствие разных типов PAR на мембране различных клеток,

включая нервные терминалы, где они участвуют в регуляции кальциевого гомеостаза и синаптической пластичности. Показано наличие PAR1 в моторных синапсов, но их роль в регуляции секреции ацетилхолина (АХ) – мало изучена. Целью работы было исследование действия экзогенного пептида-агониста PAR1 – TRAP-6 – на параметры спонтанной секреции квантов АХ.

Эксперименты проводились на нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши с использованием микроэлектродной регистрации миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП). Анализировали амплитуду МПКП, их частоту и временной ход.

TRAP-6 (1 мкМ) увеличивал амплитуду МПКП на 23% от контроля, не изменяя частоту и временной ход МПКП. В ходе отмывки от TRAP-6 амплитуда МПКП не возвращалась к контрольному уровню, а продолжала увеличиваться – до 37% от контроля. Ингибитор везикулярной Н-АТФазы, прекращающий загрузку АХ в везикулы – бафиломицин А1 (0,5 мкМ) предотвращал прирост амплитуды МПКП, вызываемый TRAP-6. Эти данные позволяют предполагать, что эффекты TRAP-6 связаны с его рецепторным действием на PAR1 в моторных синапсах, направленным на увеличение размера кванта АХ.

Анализ сигнальных механизмов, запускаемых при действии TRAP-6, выявил определенное участие освобождения депонированного кальция в реализации эффектов пептида-агониста. Блокатор рианодиновых рецепторов рианодин (5 мкМ) – не изменил прирост амплитуды МПКП при аппликации TRAP-6, однако полностью предотвращал увеличение амплитуды МПКП на отмывке. Блокатор протеинкиназы А (ПКА) – Н-89 (1 мкМ) – эффективно предотвращал возрастание амплитуды МПКП под действием TRAP-6, что может свидетельствовать о запуске каскадов с участием ПКА при активации PAR1-рецепторов.

Таким образом, впервые показано, что активация PAR1-рецепторов экзогенным пептидом-агонистом приводит к возрастанию амплитуды МПКП в моторных синапсах мыши за счет прироста размера кванта АХ с участием депонированного кальция и ПКА.

Оценка эффективности ноотропных препаратов в новой экспериментальной модели «синдрома дефицита внимания»

Боков Р.О.¹, Сухорукова Н.А.²

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия, Москва

romanbokov94@yandex.ru, natalipharm@mail.ru

«Синдром дефицита внимания» (СДВ) – неврологическо-поведенческое расстройство развития, начинающееся в детском возрасте. Для него характерны такие симптомы, как трудности концентрации внимания, обучения и социальной адаптации. С неврологической точки зрения СДВ рассматривается как стойкий и хронический синдром, для которого не найдено способа излечения.

В современной психофармакологии для оценки эффективности препаратов применяется ряд трансляционных моделей СДВ с использованием линий животных различного генетического статуса, трудоемких в своем получении и требующих предварительного обучения в ходе эксперимента. В лаборатории радиоизотопных методов исследований НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН предложен новый тест состояния «дефицита внимания» на основе аутбредной линии мышей CD-1 – «закрытый

обогащенный крестообразный лабиринт». Преимуществами метода являются простота выполнения экспериментов, его неинвазивность и отсутствие воздействия внешних стимулов. Закрытый обогащенный крестообразный лабиринт по ряду показателей позволяет одновременно оценивать в эксперименте широкий спектр возможного действия вещества (ноотропное, транквилизирующее, седативное и психостимулирующее).

Целью работы являлось сравнительное исследование влияния 5-ти кратного внутривентрикулярного введения препаратов Пантогам (D-Гопантенная кислота) (100 мг/кг) и Пантогам актив (D,L-Гопантенная кислота) (200 мг/кг) на показатели поведения субпопуляций мышей аутбредной линии CD-1 в тесте «закрытый обогащенный крестообразный лабиринт».

В тесте были обнаружены два фенотипа грызунов, различающиеся по величинам индекса внимания к объектам в боковых отсеках установки (ED-ratio). Грызуны подтипа ED-low характеризовались дефицитом внимания к объектам по сравнению с животными подтипа ED-high. В серии экспериментов были исследованы следующие группы: группа «Контроль» в обеих субпопуляциях (в/б введение физ. раствора в объеме 30 мкл), группа «Пантогам» в обеих субпопуляциях и группа «Пантогам актив» в обеих субпопуляциях (в/б введение раствора препарата в дозе 100 мг/кг и 200 мг/кг в объеме 30 мкл). Поведение регистрировалось в полуавтоматическом режиме в программе «Behaviour». Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica 10.0.

Введение Пантогама актив вызывало увеличение двигательной активности (130% к контролю, $p < 0,05$) и уменьшение значения ED-ratio (51% к контролю, $p < 0,005$) в группе ED-High, а в группе ED-Low – увеличение индекса внимания (291% к контролю, $p < 0,005$). Пантогам в выбранном режиме введения проявил большую избирательность действия, вызвав увеличение индекса ED-ratio только в группе грызунов с исходным дефицитом внимания к объектам (383% к контролю, $p < 0,005$).

Заключение: Установленные особенности аутбредной линии мышей CD-1 делают возможным ее использование в качестве модели СДВ как экспресс-теста в поиске и оценке средств для коррекции данного патологического синдрома. При сопоставлении поведенческих эффектов исследуемых препаратов было выявлено специфическое влияние Пантогама на субпопуляцию животных с дефицитом внимания.

Участие эндоканнабиноидной системы в структурно-функциональных изменениях головного мозга, вызванных эпилептическим статусом

Борисова Мария Александровна, Сулейманова Елена Мирзануровна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва

Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

telpromena9006@mail.ru

Длительная судорожная активность при эпилептическом статусе может вызвать различные структурно-функциональные нарушения головного мозга, приводящие к развитию хронической эпилепсии и коморбидных поведенческих нарушений, включая депрессию и тревожные расстройства. Эндоканнабиноидная система мозга активируется при избыточном возбуждении постсинаптической мембраны, что приводит к уменьшению выброса глутамата и ГАМК из пресинаптического окончания и ограничению синаптической передачи, что делает ее многообещающим объектом в исследованиях

механизмов эпилепсии. Цель нашей работы — выяснение роли эндоканнабиноидной системы в развитии поведенческих нарушений при височной эпилепсии у крыс.

Работа проводилась на взрослых самцах крыс Wistar (n=48) на модели литий-пилокарпинового эпилептического статуса (ЭС). Через четыре часа после окончания ЭС группе WIN вводили агонист эндоканнабиноидных рецепторов WIN-55,212-2 (5 мг/кг; группе DMSO вводили эквивалентный объем растворителя — 5% DMSO). Через четыре месяца проводили батарею поведенческих тестов: тест на потребление сахарозы, тесты “Темно-светлая камера” (ТСК), “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), “Открытое поле” (ОП).

В тесте на потребление сахарозы 12,5% контрольных крыс, 14,3% крыс группы WIN и 37,5% крыс группы DMSO не предпочитали сахарозу воде. Тест ТСК показал, что крысы, перенесшие ЭС, находились в светлом отсеке дольше, чем крысы групп DMSO и WIN. Между группами DMSO и WIN различий не выявлено. В тесте ПКЛ крысы, перенесшие ЭС, проводили больше времени в открытых рукавах, чем контрольные, а также продемонстрировали повышенную двигательную активность. У крыс группы DMSO отмечалось большее число дефекаций, чем у контрольной группы, крысы группы WIN не отличались от контрольных. В тесте ОП крысы, перенесшие ЭС, проявляли большую двигательную активность, чем контрольные, однако различий между группами WIN и DMSO выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии значительных поведенческих нарушений у крыс в отдаленный период после литий-пилокарпинового ЭС. Во всех тестах отмечалась гиперактивность животных, препятствующая оценке тревожности. Активация эндоканнабиноидной системы не предотвращала гиперактивность, но уменьшала выраженность депрессивно-подобного и эмоционального поведения. Таким образом, активация эндоканнабиноидной системы может играть роль в развитии некоторых поведенческих нарушений после ЭС.

Влияние краткосрочного пребывания на международной космической станции на поведение дрозофилы

Боровкова К.Е.¹, Гончарова А.А.²

¹ФГАОУ ВО Волгоградский государственный университет
Институт естественных наук, Волгоград

²ФГБУН Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург
krisdior93@gmail.com

Эксперименты на животных в условиях, имитирующих космический полет, начали проводить еще в первой половине 20 века. Однако до сих пор нет ясной картины того, как разнообразные факторы полета и пребывания в космосе влияют на функционирование организма животных и человека. Использование в подобных экспериментах дрозофилы способствует изучению влияния космических полетов не только на наследственность и изменчивость, но и помогают выявить функциональные нарушения моторных функций.

В своей работе мы сравнили параметры локомоторной активности, звукопродукции и взбирательной активности взрослых самцов *Drosophila melanogaster* из природной популяции после 10-дневного пребывания на МКС (50 особей в группе) с контрольными самцами, оставшимися на Земле (50 особей в группе). Локомоторную активность тестировали в одиночных камерах, тестирование звукопродукции (песни, исполняемой

самцом при ухаживании) проводили с оплодотворенной самкой, при тестировании взбирательной активности формировали группы из 8-11 особей.

Влияние 10-дневного пребывания в космосе на параметры локомоторной активности, оказалось незначительным: было обнаружено лишь небольшое увеличение частоты инициации побежки. Способность взбираться вверх у дрозофил, пребывавших в космосе, оказалась ниже, чем у особей, не покидавших земную поверхность. Сравнение параметров звукопродукции показало, что у мух после полета произошло уменьшение межимпульсного интервала в песне ухаживания самца, т.е. полет повлиял на работу центрального генератора паттерна импульсной песни.

Крайне незначительные изменения параметров двигательной активности и звукопродукции свидетельствуют об отсутствии вредоносного влияния краткосрочного пребывания на МКС на нервные и мышечные структуры самцов дрозофилы из природной популяции, участвующие в реализации изученных моторных функций. Разница в полученных результатах опытов с локомоторной активностью и взбиранием показала, что в горизонтальной плоскости мухам двигаться легче, чем в случае со взбиранием, где задействуется больше нервных и мышечных структур.

Исследование роли упругой деформации мягкотканых структур конечностей в локомоции млекопитающих

Владовская Антонина А.

МГАВМиБ имени К.И.Скрябина, Россия, Москва

anna-bruleva@yandex.ru

На кадаверном материале различных видов млекопитающих исследовали особенности упругой деформации мягкотканых органов и структур конечностей, одновременно участвующих в локомоторном акте. Учитывали видовую специфику локомоторных характеристик, а в число объектов исследования включили также участки кожи, прочно присоединённые к подлежащим мышцам и, вероятно, использующиеся в качестве поверхностного натяжного скелета, принимающего на себя часть динамических нагрузок как при преодолевающем, так и при уступающем режиме работы данных мышц.

По результатам эксперимента сопоставляли и анализировали графики деформации.

Результаты работы подтвердили выдвинутое нами предположение, что при воздействии растягивающей нагрузки характер деформативных изменений выделенных мышц грудной и тазовой конечностей, отражает их упруго-деформативные характеристики в живом организме. Показано, что в фазе амортизации у специализированных в беге животных упругое растяжение амортизирующих мягкотканых структур происходит в асинхронном режиме с постепенным выравниванием графиков растяжения к моменту максимальной механической нагрузки. На участках плотного присоединения кожного покрова к мягкотканым структурам, подвергающимся упругим деформациям при быстром беге, кожа, наряду с указанными в модели А.Хилла компонентами, может участвовать в процессах аккумуляции и возвращения упругой энергии.

Результаты исследования имеют не только общебиологическое значение, но также могут найти отражение в практике ортопедии и реабилитационной терапии при травмах опорно-двигательного аппарата.

**Влияние пренатальной алкогольной интоксикации на поведение
и морфометрические показатели в период раннего постнатального
развития белых крыс**

Водорезова К. Г.

*МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов, Россия, Москва
trustyourt@gmail.com*

Пренатальная алкогольная интоксикация приводит к развитию у детей комплекса морфо-физиологических и психо-неврологических нарушений, известных как фетальный алкогольный спектр нарушений (ФАСН). Эти нарушения возникают вследствие употребления матерью алкоголя во время беременности. В качестве экспериментальной модели ФАСН используется хроническая принудительная алкоголизация самок крыс во время беременности. На протяжении всего периода беременности самки получают 10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости. После рождения потомства самок переводят на воду, таким образом, выкармливание потомства проводилось в отсутствие алкогольного влияния.

В нашей работе исследовали влияние пренатальной интоксикации алкоголем на становление ряда моторных рефлексов: переворот со спины на лапы (6 постнатальный день - ПНД), отрицательный геотаксис (на поверхностях, расположенных под углом 15° и 45° к земле, 13 ПНД), выход из круга – «gait» (11 ПНД). В дни проведения тестов проводили оценку показателей физического развития, таких как: масса тела, длина хвоста, длина и ширина головы. Оценка ориентировочно-исследовательской активности проводилась с помощью теста «Открытое поле» (21 ПНД). В работе участвовали две группы крысят: «контроль» - потомство самок, получавших во время беременности в качестве питья воду; «опыт» - потомство самок, получавших во время беременности алкоголь.

В тесте «открытое поле» локомоторная активность крысят опытной группы снижена, по сравнению с показателями контрольной группы, что проявляется в уменьшении количества пройденных секторов и активности в центре арены. Также выявлены различия между группами в динамике изменений стоек и эпизодов груминга. Морфометрия показала, что крысята опытной группы, отстают в весе и имеют меньшие размеры головы. В тестах на моторные рефлексy статистически значимых различий выявлено не было. Полученные результаты позволяют предположить, что крысята с ФАСН имеют комплекс поведенческих и физических нарушений, сходных с последствиями пренатальной алкогольной интоксикации у детей. Модель ФАСН на грызунах можно рассматривать как объект для тестирования препаратов, применяемых для лечения этой патологии у людей.

Работа была проведена при поддержке гранта РФФИ 16-04-01009 А.

Влияние повышенных доз гомоцистеина в пренатальный период на скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов у крыс

Гильмутдинов Амир Ильфатович, Янгирова Дания

*Казанский Федеральный (Приволжский) Университет,
Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, Россия, Казань
a-olay@yandex.ru*

Гомоцистеинемия – это заболевание, связанное с повышенным содержанием гомоцистеина (более 15 мкм/л), производного превращения метионина, в плазме крови. Гомоцистеин способен проникать через плаценту и вызывать нарушения в развитии плода.

В эксперименте участвовали 88 крысят в возрасте от 0 до 16 дня жизни, которые были получены от 12 самок, поделенных поровну на контрольную и опытную группу. Самки опытной группы в течение 3 недель до наступления беременности, до и после родов получали метионин в дозе 7,7 г/кг в сутки, а самки контрольной группы находились на стандартном рационе питания.

Изучение пренатального повреждающего нейротоксического действия веществ при помощи поведенческих тестов позволяет оценить серьезные нарушения развития животных в динамике. Оценивалось физическое развитие крысят: ежедневно определяли вес животных опытной и контрольной групп, отлипание ушной раковины, появление волосяного покрова и открытие глаз. Для исследования соматосенсорного созревания в крысят использовали стандартную батарею тестов по оценке развивающегося поведенческого фенотипа крыс в период вскармливания.

В опытной группе при оценке физического развития крысят (отлипание ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз) не отмечено значимых отставаний в развитии при сравнении с показателями контрольных животных.

Наиболее важным показателем соматического развития животных является динамика массы тела. При анализе динамики веса новорожденных крысят был показан недобор веса животных опытной группы по сравнению с контрольными животными.

Пренатальное повреждающее нейротоксическое действие гомоцистеина изучалось по формированию сенсомоторных реакций в постнатальный период. В тестах, проводимых в ранний период развития животных (P2-P9), достоверных изменений между контрольной и опытной группой было не выявлено лишь в двух тестах: «отрицательный геотаксис» и реакции на акустический стимул.

В тесте «переворачивание на горизонтальной плоскости» не наблюдалось достоверных отличий в дне формирования рефлекса (8 день после рождения), но было достоверно установлено более быстрое исполнение рефлекса у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Так же «маятниковый» рефлекс у крысят обеих групп сформировался к 8 дню жизни, но количество поворотов головы за минуту достоверно меньше у опытной группы, чем у контрольной.

В тесте «избегание обрыва» с фиксированным временем (10 секунд) мы наблюдали достоверное замедление формирования рефлекса в опытной группе. Так у крысят контрольной группы этот рефлекс был сформирован к 6 дню жизни, а в опытной группе только к 7 дню. Мышечная сила у крысят контрольной группы на протяжении заданного периода наблюдений была больше чем в опыте.

Таким образом, при оценке состояния неврологического развития на ранних сроках развития у животных опытной группы было отмечено значимое отставание в развитии по сравнению с контрольными животными.

Импульсная активность нейронов ядра солитарного тракта после интраназального введения гамк и L-глутамата

Гладкова Жанна Анатольевна, Тихонович О.Г.

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Беларусь, Минск
gladkova_z@mail.com*

Воздействие гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и L-глутамата на организм человека и животных изучается давно, но центральные механизмы действия при моделировании экстремальных ситуаций (гипобарическая гипоксия) не изучены.

Острые опыты проводили на наркотизированных (нембутал и уретан в пропорции 30 и 500 мг/кг) животных. Аппликацию ГАМК (20 мкл 0.0003% р-ра) и L-глутамата осуществляли на слизистую оболочку полости носа через 1 час после моделирования гипобарической гипоксии (создавая разряжение в сосуде в течение 5 минут). Регистрировали частоту разрядов нейронов (ЧРН), электрокардиограмму (ЭКГ) во втором стандартном отведении, частоту дыхания (ЧД) и глубину дыхания, ректальную температуру.

Интраназальная аппликация L-глутамата сопровождалась увеличением импульсной активности нейронов ядра солитарного тракта и ЧД. Инстилляцией ГАМК сопровождалась только увеличением ЧД. После моделирования 5 мин гипоксии предварительная аппликация ГАМК сопровождалась снижением ЧРН ядра солитарного тракта и частоты сердечных сокращений и увеличением ЧД. Последующая аппликация L-глутамата еще более выражено снижала ЧРН ядра солитарного тракта и частоту сердечных сокращений и не изменяла частоту дыхания. Предварительная интраназальная инстиляция L-глутамата сопровождалась снижением ЧРН ядра солитарного тракта и ЧД, и не влияла на частоту сердечных сокращений, последующая аппликация ГАМК способствовала повышению ЧРН ядра солитарного тракта, но при этом снижению частоты мердечных сокращений и ЧД. В контроле предварительное введение L-глутамата снижает ЧРН ядра солитарного тракта, а после аппликации ГАМК усиливает. Через 1,5 ч после кратковременных экстремальных воздействий повышение концентрации как тормозных, так и возбуждающих нейромедиаторов сопровождается угнетением импульсной активности нейронов ядра солитарного тракта. При этом повышение концентрации ГАМК до или после аппликации L-глутамата сопровождается снижением частоты сердечных сокращений. Влияние на ЧД увеличения концентрации ГАМК имеет разную направленность: предварительное усиливает, а последующее снижает ЧД.

Зарегистрированные факты необходимы для понимания роли баланса нейромедиаторов в контроле витальных функций.

Использование антидепрессанта флувоксамина на разных сроках беременности белых крыс влияет на поведение самок и их потомства

Груздев Глеб Андреевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

gleb-physiologist@mail.ru

Флувоксамин относится к группе антидепрессантов - ингибиторов обратного захвата серотонина, которые активно используются при лечении депрессивных расстройств во время беременности. Целью представленной работы является исследование влияния пренатального введения флувоксамина на поведение беременных самок белых крыс и проявление материнских инстинктов в первые дни после родов. Это позволит нам оценить риски чрезмерного приема препарата.

Флувоксамин вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг с 3 по 10 или с 8 по 14 дни беременности крыс. Контрольные животные в соответствующие сроки получали инъекцию воды. Тестирование ориентировочно-исследовательской и двигательной активности, а также уровня тревожности проводили на фоне введения антидепрессанта (тест «Открытое поле», тест «О-образный лабиринт») и после отмены препарата (тест «Открытое поле с норками», тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»). На 6-8 дни после родов исследовали материнское поведение крыс.

Во время введения препарата у групп, получавших флувоксамин в тесте «Открытое поле», было выявленное снижение исследовательской и двигательной активности (количество пройденных секторов, стоек), в тесте «О-образный лабиринт» значимых отличий между опытными и контрольными группами не наблюдалось.

Через трое суток после отмены препарата в тестах «Открытое поле с норками» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» у опытных групп также как и на фоне приема антидепрессанта была снижена исследовательская и двигательная активность.

Измерение размеров выводка показало, что у контрольных животных численность потомства на 26 % больше ($p < 0.03$), чем у опытных крыс, что может свидетельствовать о внутриутробной смертности зародышей после введения флувоксамина.

Таким образом, у беременных самок белых крыс принимающих флувоксамин наблюдается снижение уровня ориентировочно-исследовательской и двигательной активности во время беременности и повышение уровня тревожности в первые дни после родов. Прием флувоксамина достоверно уменьшает численность потомства.

Пресинаптические эффекты кальцитонин-ген-родственного пептида в зрелых и новообразуемых моторных синапсах мышцы

Голикова Е.А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

katushka123321@mail.ru

Кальцитонин ген-родственный пептид (КГРП) – нейропептид, образующийся в ходе альтернативного сплайсинга гена кальцитонина. В нервной терминали КГРП находится в составе пула электронноплотных везикул и оказывает целый ряд длительных эффектов на скелетную мышцу. Целью данного исследования было изучение возможного острого пресинаптического действия экзогенного КГРП в зрелых и новообразуемых на 11 сутки после денервации нервно-мышечных синапсах мышцы.

С помощью стандартной микроэлектродной техники отведения биопотенциалов регистрировали спонтанные миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные стимуляцией нерва потенциалы концевой пластинки (ПКП) мышцы - длинного разгибателя пальцев (*m.EDL*) мыши. Анализировали амплитуду, временной ход МПКП и ПКП, а также квантовый состав ПКП.

Анализ эффектов двух изоформ КГРП – человека и крысы (идентичного эндогенному КГРП мышцы) - в концентрации 10 нМ показал, что обе изоформы КГРП вызывают прирост амплитуды ПКП на 33% по сравнению с контролем в ходе ритмической (50 Гц, 1 сек) активности синапсов (одинаковый прирост амплитуды наблюдался для каждого из 50-ти ПКП в коротком залпе). Амплитуда МПКП была также повышена на 25-30%, но квантовый состав ПКП достоверно не изменился. Также, частота и временной ход МПКП не были затронуты. Это свидетельствует о пресинаптическом действии КГРП. Повышение амплитуды МПКП полностью предотвращалось блокатором рецептора КГРП – КГРП 8-37 (0,5 мкМ) и блокатором везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом (1 мкМ). В новообразуемых нервно-мышечных синапсах экзогенный КГРП также повышал амплитуду МПКП и ПКП на 23%, не влияя при этом на квантовый состав и временной ход синаптических потенциалов и частоту МПКП.

Полученные данные свидетельствуют о том, что экзогенный КГРП имеет сильные потенцирующие эффекты в зрелых моторных синапсах мышцы за счет увеличения размера кванта медиатора. В ослабленных новообразуемых моторных синапсах, КГРП аналогичным образом усиливает нервно-мышечную передачу, таким образом имея возможное терапевтическое значение.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00554 А.

Влияние агонистов рецепторов, активируемых протеазами первого типа, на дегрануляцию клеток линии RBL-2H3 при гипергликемии.

Голяко И.А.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
gi399@yandex.ru*

Одними из участников процесса воспаления являются тучные клетки. Развитие воспаления сопровождается их дегрануляцией, что служит маркером интенсивности процесса. Известно, что рецепторы, активируемые протеазами (ПАР), участвуют в регуляции активности тучных клеток. Сериновые протеазы – тромбин и активированный протеин С (АПС), активируя один и тот же рецептор – ПАР1, вызывают противоположные эффекты, про- и противовоспалительные, соответственно. Это обусловлено расщеплением разных пептидных связей N-конца рецептора. Нарушение метаболизма глюкозы сопровождается различными заболеваниями и приводит к изменению реакции организма на повреждающие воздействие. Поэтому изучение участия ПАР в регуляции воспалительного ответа на фоне гипергликемии весьма актуально. В связи с этим, цель настоящего исследования – изучить влияние тромбина и АПС на активность тучных клеток при гипергликемии *in vitro*.

Эксперименты были выполнены на культивируемых аналогах тучных клеток – линии RBL-2H3. Уровень дегрануляции оценивали по количеству высвободившегося фермента β-гексозаминидазы. Моделирование нормогликемии или гипергликемии

осуществляли инкубацией клеток в среде, содержащей 1 или 4.5 г/л глюкозы, соответственно.

Иммуноцитохимически, с использованием конфокальной микроскопии нами показана экспрессия ПАР1 клетками линии RBL-2H3. Мы оценили влияние двух концентраций тромбина – 10 и 50 нМ на секрецию β -гексозаминидазы. Установлено, что в условиях нормогликемии тромбин не вызвал воспалительного ответа, в то время как гипергликемия приводила к возрастанию секреции β -гексозаминидазы на 17,5%, по сравнению с контролем, в присутствие тромбина в концентрации 50 нМ. Это указывает на провоспалительное действие тромбина в концентрации 50 нМ, по сравнению с 10 нМ, что подтверждает полученные ранее нами данные на астроцитах. Инкубация клеток с АПС или пептидом-агонистом ПАР1, аналогично тромбину, не изменяло уровня секреции RBL-2H3 при нормогликемии. При гипергликемии АПС и пептид, в противоположность тромбину, снижали уровень спонтанной секреции β -гексозаминидазы на 12 и 14%, соответственно. Таким образом, нами обнаружено, что гипергликемия потенцирует эффекты тромбина, АПС и его пептидного аналога на RBL-2H3, про- и противовоспалительный, соответственно. Полученные результаты демонстрируют возможность разработки новых противовоспалительных препаратов на основе АПС и его пептидного аналога, эффективных при тяжёлых заболеваниях, таких как сахарный диабет.

**Оценка секреторной активности вазопрессинергических нейронов крыс
линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии**

Горбачёва Евгения Леонидовна

*Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,
Россия, Санкт-Петербург
jengorbacheva@gmail.com*

Взаимосвязь между интенсивностью секреции вазопрессина и предрасположенностью к эпилептиформной активности была отмечена довольно давно. На фармакологических моделях эпилепсии были показаны как усиливающие, так и подавляющие судорожную активность эффекты вазопрессина. Роль вазопрессинергической системы в формировании предрасположенности и в реализации судорожной активности на генетических моделях эпилепсии практически не изучалась. Целью данного исследования была оценка функционального состояния вазопрессинергической системы у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), характеризующихся предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии, и у крыс линии Вистар.

В работе были использованы 4,5 – 5 месячные интактные крысы линии КМ и линии Вистар. Методом гибридизации *in situ* была проведена оценка содержания мРНК вазопрессина в нейронах гипоталамуса. Содержание вазопрессина, GAD67 и vGlut2 в гипоталамо-гипофизарной системе было оценено с помощью иммуногистохимического метода. Концентрация вазопрессина в сыворотке крови была определена с помощью иммуноферментного анализа.

Показано отсутствие достоверных различий в содержании мРНК вазопрессина в нейронах супраоптического (СОЯ) и паравентрикулярного (ПВЯ) ядер гипоталамуса крыс линии КМ и линии Вистар. При этом содержание вазопрессина в нейронах СОЯ крыс линии КМ было снижено, а в нейрогипофизе – повышено по сравнению с крысами линии

Вистар, что указывает на снижение интенсивности секреции вазопрессина в кровь, что подтверждается пониженной концентрацией вазопрессина в сыворотке крови. В СОЯ и ПВЯ, а также в срединном возвышении крыс линии КМ показано повышение плотности GAD67-иммунопозитивных волокон, что свидетельствует о повышенной активности тормозной ГАМК-ергической регуляции этих структур. Различий в плотности VGlut2-иммунопозитивных волокон в СОЯ, ПВЯ, срединном возвышении и в нейрогипофизе выявлено не было. Таким образом, снижение секреторной активности вазопрессинергической системы может быть вызвано нарушением работы ГАМКергической системы регуляции активности нейронов гипоталамо-гипофизарной системы у крыс линии КМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-00811).

Влияние хронической перинатальной гипоксии на поведенческие паттерны и показатели сердечной деятельности крыс

Замятина Лидия Аркадьевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

zamyatina.lidia@gmail.com

По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения первое место в структуре перинатальной смертности принадлежит внутриутробной гипоксии и асфиксии в родах, которые составляют около 48%. Отставленные эффекты перинатальной хронической гипоксии (ПХГ) мало изучены, целью данного исследования явилось изучение влияний ПХГ в разные сроки позднего периода эмбрионального развития на развитие крыс в препубертатном периоде.

Моделирование ПХГ беременных крыс осуществляли в барокамере с 14% содержанием кислорода в течение 5 часов. Самки были распределены на три группы: КОНТРОЛЬ(К) – животные, не подвергавшиеся гипоксии (N=5); ГИПОКСИЯ-1(Г1) – подвергались гипоксии на 17-19-й дни беременности (N=4); ГИПОКСИЯ-2(Г2) – на 20-21-й дни беременности (N=4). Влияние ПХГ на развитие потомства оценивали по морфометрическим показателям, показателям поведенческой активности на 22-й и 36-й дни постнатального развития в тестах «Норковая камера»(НК) и «Приподнятый крестообразный лабиринт»(ПКЛ) и по параметрам variability сердечного ритма на 36-й день жизни.

Ретроспективный анализ всех регистрируемых показателей не выявил значимых межполовых различий ни в контрольной, ни в экспериментальной группах, поэтому все данные по самцам и самкам объединили и анализировали совместно. Снижение массы тела при рождении и сниженный индекс Кетле на 36-й день групп Г1(N=38) и Г2(N=45) по сравнению с крысятами группы К(N=53) свидетельствует об отставании в физическом развитии. Крысята группы Г1 в тестах ПКЛ и НК на 22-й и 36-й дни жизни продемонстрировали повышенный уровень тревожности и сниженную горизонтальную и вертикальную двигательные активности, показатели вегетативного баланса у них не изменялись. У крысят группы Г2 в тестах ПКЛ и НК наблюдали разнонаправленные изменения поведенческих паттернов: в НК на 22-й и 36-й дни жизни у крысят было увеличение уровня тревожности, в ПКЛ – снижение. Анализ вегетативного баланса у крысят группы Г2 выявил смещение в сторону усиления симпатического компонента.

По результатам проведенного исследования было показано, что ПХГ на разных стадиях внутриутробного развития может оказывать различные эффекты на постнатальное развитие.

**Исследование изониазидовой модели эпилепсии как альтернативы
пентилентетразоловой**

Зыбина Анна Михайловна, Куличенкова Ксения Николаевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
ancula888@gmail.com*

Существует большой выбор моделей эпилепсии, как для скрининга лекарственных препаратов, так и для изучения механизмов судорожных состояний мозга. Используют методы введения различных хемоконвульсантов, самым распространенным из которых является пентилентетразол (ПТЗ антагонист ГАМК_a рецепторов), метод максимального электрошока, модель электрического киндлинга и т.д. Выбор используемой модели зависит от поставленной задачи в экспериментах, при этом не все антиэпилептические препараты (АЭП) эффективны на каждой модели эпилепсии. Кроме того, большинство моделей изменяют проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что ограничивает их использование при изучении определенных задач. Одной из малоизученной моделью в этом направлении является изониазидовая модель эпилепсии. Цель работы: исследовать проницаемость ГЭБ для флуоресцентного красителя Evans Blue (ЕВ40 мг/кг в/в) в норме и на фоне судорог, вызванных изониазидом (ИЗН, блокатор ГАМК-аминотрансферазы, 300 мг/кг в/б). В экспериментах использовали крыс Wistar. Тяжесть судорог оценивали по пятибалльной шкале Racine. Из литературных источников известно, что в норме исследуемый краситель не проникает через ГЭБ, поэтому в качестве контроля использовали внутрижелудочковое введение ЕВ (10 мкл 2% раствора). Визуальная оценка срезов головного мозга показала отсутствие проникновения красителя Evans Blue в головной мозг. Флуоресцентная микроскопия срезов мозга также не выявила флуоресценции ни в одной из исследуемых групп. Визуальная и флуоресцентная оценка срезов свидетельствуют о сохранении целостности ГЭБ в течение эксперимента. Известно, что при инициации судорог ПТЗ, проницаемость ГЭБ возрастает. С повышением проницаемости ГЭБ может снизиться поиск эффективной дозы препарата. Таким образом, исследуемая изониазидовая модель, на которой мы показали целостность ГЭБ, позволяет точнее оценивать эффективные дозы АЭП.

Исследование альтернативных моделей эпилепсии необходимо, так как ни одна модель не является универсальной и не охватывает весь спектр известных на сегодняшний день АЭП. Известно, что на ПТЗ-модели неэффективны модуляторы работы быстрых натриевых каналов (карбамазепин, фенитоин и др.), которые показывают эффективность на ИЗН-модели. Разнообразие моделей может помочь при исследовании новых АЭП и позволит не пропустить новые эффективные соединения.

Авторы выражают благодарность научному руководителю, доценту, к.б.н. Кенуль Расимовне Аббасовой.

Влияние блокаторов тока аномального выпрямления на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани торакальных вен крысы

Иванова А.Д.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
ashka02@yandex.ru*

Миокардиальная ткань, формирующая обкладку торакальных (полых и легочных) вен, обладает рядом биоэлектрических свойств, способствующих возникновению аритмий. «Аритмогенность» этой ткани может быть связана с локальными различиями в уровне калиевого тока аномального выпрямления (I_{K1}). Цель настоящей работы заключалась в исследовании действия блокаторов I_{K1} на потенциалы действия (ПД) и спонтанную активность в миокарде полых и легочных вен крысы.

Эксперименты выполняли на изолированных перфузируемых многоклеточных препаратах правой полой вены (ППВ), правого предсердия (ПП), легочных вен (ЛВ) и левого предсердия (ЛП) крысы (самцы, 3-4 мес, 250-300 г). Регистрацию ПД осуществляли при помощи стандартной микроэлектродной техники. Оценивали изменение длительности ПД на уровне 90% реполяризации (ДПД90), вызванное блокаторами I_{K1} - барием, спермином или хлорохином.

В контрольных условиях ДПД90 в ПП и ППВ составляла 42.13 ± 6 мс ($n=12$) и $61,76 \pm 6$ мс ($n=12$). Ba^{2+} (50 μM) вызывал увеличение ДПД90 в ПП (на $42.4 \pm 9\%$, $n=6$, $p(T) < 0.05$) и в ППВ (на $23,2 \pm 5\%$, $n=6$, $p(T) < 0.05$). Спермин (250 μM) вызывал кратковременное увеличение ДПД90 в ПП и ППВ ($25.1 \pm 5\%$, $n=6$, и $18.0 \pm 3\%$, $n=6$; $p(T) < 0.05$). Региональные различия в увеличении ДПД90 при действии Ba^{2+} и спермина выявить не удавалось. Хлорохин (5 μM) вызывал увеличение ДПД90 и в ПП и в ППВ ($17.3 \pm 1\%$, $n=6$, и $29.1 \pm 1\%$, $n=6$; $p(T) < 0.05$); эффект хлорохина в ППВ был значимо больше, чем в ПП ($p(U) < 0.05$). В контрольных условиях ДПД90 в ЛП и ЛВ составляла $34,9 \pm 4$ мс ($n=6$) и $55,1 \pm 7$ мс ($n=6$). Хлорохин (5 μM) вызывал увеличение ДПД90 в ЛП и ЛВ ($7.1 \pm 2\%$, $n=6$, $p(T) < 0.05$ и $23.4 \pm 3\%$, $n=6$; $p(T) < 0.05$), эффект хлорохина в ЛВ был значимо больше ($p(U) < 0.05$), чем в ЛП. Блокаторы I_{K1} оказывали незначительное влияние на спонтанную активность в изолированных препаратах правого предсердия и торакальных вен (ритм изменялся в пределах 2-7%). Однако, при действии блокаторов I_{K1} в ППВ и ПП наблюдали эпизоды высокочастотной спонтанной активности.

Большой эффект хлорохина в миокарде торакальных вен по сравнению с предсердным миокардом позволяет предположить, что количество каналов, переносящих ток I_{K1} (семейство $Kir2.X$), снижено в ВПП и ЛВ по сравнению с предсердиями. Эта особенность может лежать в основе увеличенной ДПД миокарда вен, способствовать облегчению деполяризации и возникновению спонтанной «аритмогенной» активности в торакальных венах при действии нейрогуморальных факторов.

Влияние унилатеральной корковой инактивации на спонтанную абсансную судорожную активность

Колотова Дарья Евгеньевна, Солодков Роман Викторович

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
l-f-i-f_dasha@mail.ru*

Исследования последних лет ставят под сомнение традиционное представление о ведущей роли таламуса в генезе пик-волновых разрядов при спонтанной абсансной эпилепсии. Новая теория касательно инициации и генерализации абсансных приступов отводит ведущую роль соматосенсорной коре (SmI) с расположением фокуса в глубоких слоях (слой VI) коры периоральной зоны. Электроэнцефалографическим признаком абсансной эпилепсии являются билатеральные, синхронные и симметричные пик-волновые разряды с частотой 3-4 Гц у пациентов и 8-11 Гц у крыс. Основную роль в формировании и генерализации пароксизмальных разрядов нейронов отводится соотношению активности глутаматергической и ГАМКергической систем мозга.

Цель работы: исследовать действие фармакологической односторонней инактивации кортикального фокуса абсансной эпилепсии на крысах линии WAG/Rij.

Работа выполнена на самцах крыс линий WAG/Rij (n=6). Под общим наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг) вживлялись ЭЭГ электроды и канюли для микроинъекций. Канюлю размещали в правом полушарии непосредственно над представительством вибрисс в SmI. Для регистрации ЭЭГ использовали 2 записывающих кортикальных электрода. В качестве фармакологического агента использовали блокатор ГАМК-трансаминазы вигабатрин в дозе 30 мкг/1.5 мкл. Вигабатрин (ВГБ) необратимо блокирует активность ГАМК-трансаминазы (фермента деградации ГАМК), повышает синаптосомальную и внеклеточную концентрацию ГАМК в головном мозге. По литературным данным ВГБ повышает концентрацию ГАМК в мозге в течение не менее 24 часов, поэтому эффекты ВГБ тестировали через 2 и 24 часа после его введения.

Результаты работы показали достоверное снижение общей длительности и количества пик-волновых разрядов абсансной эпилепсии через 2 и 24 часа после введения ВГБ. В течение 15 мин введения ВГБ пик-волновые разряды не регистрировались и полностью подавлялись к концу первого часа регистрации. Подавление пик-волновых разрядов было зарегистрировано также в контралатеральном полушарии. Таким образом, усиление торможения, вызванного повышением уровня ГАМК в области SmI, снижал триггерную активность, подавляя пик-волновые разряды.

Полученные результаты доказывают «теорию кортикального фокуса», согласно которой соматосенсорная кора является источником генерации пик-волновых разрядов при абсансной эпилепсии.

Авторы выражают благодарность научному руководителю, доценту, к.б.н. Кенуль Расимовне Аббасовой.

Контроль показателей частоты пульса и дыхания у лошадей, во время применения строгого метода фиксации

Корнакова Дарья Евгеньевна

*ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева» Россия, Москва
luluyt@mail.ru*

В коневодстве бывает необходимо применять строгий метод фиксации, для зоотехнических или ветеринарных манипуляций, поддержания лошади в неподвижном состоянии.

Чтобы усмирить лошадей применяют петлевидные, а также деревянные или металлические закрутки, которые накладывают не более чем на пять минут на верхнюю губу или ухо. Если животное испытывает боль, у него повышаются показатели частоты пульса и дыхания.

Нами были проведены исследования по измерению частоты дыхания и пульса на двенадцати лошадях, до применения закрутки, во время закрутки и спустя 2 минуты после снятия закрутки.

Результаты показали, что достоверных изменений частоты сердечных сокращений и частоты дыхательных движений во время применения и спустя 2 минуты после снятия закрутки, не произошло.

Таким образом, можно сделать вывод, что болезненный порог во время применения закрутки лошадь не испытывает.

Более спокойное поведение можно объяснить тем, что закрутка воздействует на рефлекторные точки верхней губы, вызывающая у лошади определенную реакцию по расслаблению и отвлечению от иных манипуляций.

Чувствительность к фармакологическому киндлингу в раннем возрасте и последующее МРТ-исследование взрослых крыс линии WAG/Rij

***Куличенкова Ксения Николаевна, Зыбина Анна Михайловна,
Солодков Роман Викторович***

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
koulitchenkova@gmail.com*

Экспериментальных данных об устойчивости ко вторичной генерализации крыс с абсансной эпилепсией в раннем возрасте, в отсутствие пик-волновых разрядов, нет.

Цель работы: изучить устойчивость к лимбическим судорогам и последствия эпилептизации пентилентетразолом (ПТЗ) у крыс с абсансной эпилепсией линии WAG/Rij в возрасте 25 дней с последующим МРТ-исследованием структур мозга в более поздний период развития (ПД90 и ПД180) в сравнении с крысами Wistar.

Использовали метод фармакологического киндлинга. В качестве экспериментальной модели абсансной эпилепсии использовали крыс линии WAG/Rij.

Оценивали соотношение устойчивых (когда не достигалось развитие тонико-клонической стадии после максимального количества инъекций, не более 30) и неустойчивых животных между крысами WAG/Rij и Wistar. В ПД90 и ПД180 проводили МРТ-исследование мозга.

Процент устойчивых к ПТЗ-киндлингу животных у линии WAG/Rij больше, чем у Wistar (82 и 45% соответственно). МРТ-исследование показало достоверное уменьшение гиппокампа у крыс Wistar через 180 дней после ПТЗ-киндлинга по сравнению с контролем. У WAG/Rij различий между группами не было. В ПД90 у WAG/Rij наблюдается пониженный Т2-сигнал в ряде лимбических структур, в возрасте ПД180 отличий между группами у WAG/Rij нет. У Wistar в ПД90 зарегистрировано повышение Т2-сигнала в миндалине, понижение в соматосенсорной коре, в возрасте ПД180 – снижение во всех исследуемых структурах. Сравнение между животными из контрольных групп показало межлинейные различия, причём в ПД90 различия более масштабные, чем в ПД180.

Таким образом, крысы WAG/Rij характеризуются устойчивостью ко вторичной генерализации лимбических судорог не только во взрослом возрасте, но и начиная с ПД25, когда еще не сформированы пик-волновые разряды. Можно предположить, что не только механизм, вовлеченный в генерацию пик-волновых разрядов, препятствует вторичной генерализации, но, возможно, существуют другие механизмы, связанные с особенностями лимбических структур. Дополнительным свидетельством таких различий является повышение Т2 сигнала в таламусе, миндалине, пириформной и периринальной коре у крыс линии WAG/Rij из контрольной группы по сравнению с Wistar с возраста ПД90, когда еще не развиты полноценные пик-волновые разряды.

Авторы выражают глубокую благодарность научному руководителю, доценту, к.б.н. Кенуль Расимовне Аббасовой.

Влияние синтетических аналогов продуктов деградации внеклеточного матрикса на секрецию гистамина тучными клетками *in vitro*

Куренкова Анастасия Дмитриевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва*

n_kurenkova@mail.ru

Известно, что в очаге воспаления внеклеточный матрикс подвергается ферментативной деградации с образованием различных пептидных фрагментов, обладающих собственной биологической активностью. Наиболее изученный из них трипептид пролил – глицил – пролин (PGP) оказывает выраженный противовоспалительный эффект, в определённой степени опосредованный его стабилизирующим действием на тучные клетки (ТК).

Однако, PGP быстро распадается до метаболитов, поэтому актуальным является поиск более стабильных форм, сохраняющих его эффекты. В связи с этим мы исследовали влияние синтетических аналогов пептидов, образующихся при деградации внеклеточного матрикса, на секрецию гистамина ТК.

Пептиды PG, GP, GPG, PGP, PLP, FPG, N-АсPGP, PGPL, PLPA, PGPA, FPLPA и Семакс (АКТГ₄₋₇-PGP) были синтезированы в Институте молекулярной генетики РАН. Изолированные перитонеальные ТК крыс инкубировали 10 минут при 37°C с исследуемыми пептидами, а затем активировали аналогом АКТГ₁₋₂₄ – Синактеном (20 мкМ). Количество секретируемого гистамина определяли методом, основанным на реакции конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом с образованием флуоресцентного комплекса.

В первой части работы исследовали дозозависимость влияния PGP на секрецию гистамина ТК. Установлено, что предобработка ТК PGP в диапазоне концентраций от $6 \cdot 10^{-5}$ до $3 \cdot 10^{-9}$ М снижает секрецию гистамина в среднем на 20%. Во второй части исследовали влияние фрагментов внеклеточного матрикса на секрецию гистамина ТК. Установлено, что пептиды PG, GP, GPG, PGP, FPG, N-АсPGP, PGPL, PGPA и Семакс в концентрации $3 \cdot 10^{-8}$ М снижали секрецию гистамина ТК на 18, 13, 22, 17, 37, 43, 22, 17 и 18% соответственно. Наиболее выраженный и статистически значимый эффект наблюдали для N-АсPGP, FPG и PGPL. Пептиды PLP, PLPA, FPLPA и RGP не оказывали влияния на секрецию гистамина.

Полученные результаты свидетельствуют о способности ряда пептидов, образующихся при деградации внеклеточного матрикса, препятствовать секреции гистамина ТК. Обладающие большей по сравнению с PGP стабильностью, N-АсPGP и PGPL являются в этом отношении наиболее активными. Мы предполагаем, что эти пептиды могут рассматриваться как агенты, модулирующие воспалительный процесс. Следует отметить присутствие в структуре активных пептидов последовательности PG, что может быть важно для понимания механизма их действия.

Спонтанная активность в миокарде межпредсердной перегородки сердца крысы при действии медиаторов вегетативной нервной системы

Леонидова С.В.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
Svetlana.leonidova@inbox.ru*

Согласно современным представлениям, основанным на данных молекулярного фенотипирования, регуляция и биоэлектрические свойства миокарда межпредсердной перегородки (МПП) могут существенно отличаться от свойств, как рабочего, так и «пейсмекарного» миокарда сердца млекопитающих. Однако, особенности нервной регуляции биоэлектрической активности миокарда межпредсердной перегородки млекопитающих практически не исследованы. Цель данной работы заключалась в изучении действия норадреналина (НА) и ацетилхолина (АЦХ) на потенциал покоя (ПП) и спонтанную активность в МПП сердца крысы.

Эксперименты выполняли с использованием изолированных многоклеточных перфузируемых (адаптированный р-р Тироде, 37°C, pH=7.4) препаратов межпредсердной перегородки сердца крысы (самцы, 3-4 мес, 250-300 г). Регистрацию ПП и спонтанных потенциалов действия (ПД) осуществляли при помощи стандартной микроэлектродной техники. Оценивали изменение ПП, а также характеристики спонтанной активности в МПП при действии НА и АЦХ (10 мкМ).

Показано, что АЦХ вызывает значительную гиперполяризацию в покоящемся миокарде МПП. Сдвиг мембранного потенциала при действии АЦХ составлял 27 ± 6 мВ ($n=6$, $p(T) < 0.05$). Столь выраженный эффект АЦХ обусловлен изначально сниженным значением ПП в покоящемся миокарде МПП. НА, в отличие от АЦХ, не оказывал значимого действия на ПП в миокарде МПП ($n=6$). Аппликация АЦХ не приводила к возникновению спонтанной активности в МПП, однако, в период времени, следовавший непосредственно за прекращением аппликации АЦХ, в большей части экспериментов возникали ритмические спонтанные ПД. Такая спонтанная активность поддерживалась в

среднем 6 минут. НА во всех экспериментах (n=6) вызывал ритмическую либо пачечную спонтанную активность в миокарде МПП, которая поддерживалась в ходе периода действия НА, а также значительное время (410 ± 60 сек (n=6, $p(T) < 0.05$)) после прекращения аппликации НА.

Таким образом, как парасимпатический, так и симпатический нейромедиатор способны вызывать спонтанную активность в миокарде МПП, которая может служить причиной возникновения аритмий. Гиперполяризующий эффект АЦХ может быть обусловлен активацией калиевого ацетилхолин-зависимого тока (IKAch). В основе спонтанной активности, вызванной в МПП НА и АЦХ, вероятно, лежат различные механизмы. К таким механизмам может относиться изменение динамики цитоплазматического кальция, активация тока натрий-кальциевого обменника, подавление калиевых реполяризующих токов.

Участие $\alpha 7$ -нХР и аденозиновых рецепторов А1-типа в ауторегуляции секреции медиатора в новообразуемых моторных синапсах мыши

Леонов Владислав Александрович

ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,

Москва, Россия

l-j-1@mail.ru

Выяснение особенностей функциональной регенерации нервно-мышечных синапсов после травмы двигательного нерва и возможностей фармакологической коррекции восстанавливающейся нервно-мышечной передачи в этот период являются актуальной и малоизученной проблемой современной нейрофизиологии. Данное исследование нацелено на выявление участия пресинаптических никотиновых холинорецепторов альфа7-типа ($\alpha 7$ -нХР) в регуляции выброса ацетилхолина (АХ), а также их возможного сопряжения с работой пресинаптических аденозиновых А1-рецепторов в новообразованных моторных синапсах мыши.

В работе исследовали нервно-мышечную передачу в моторных синапсах мышцы – длинного разгибателя пальцев - *m.EDL* мыши на 11 сутки после пережатия малоберцового нерва. С помощью микроэлектродов регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные раздражением нерва потенциалы концевой пластинки (ПКП). Сопоставляли амплитуду и квантовый состав ПКП в контроле и на фоне аппликации блокаторов и активаторов $\alpha 7$ -нХР и А1-аденозиновых рецепторов.

В регенерирующих нервно-мышечных синапсах была обнаружена способность антагониста альфа7-нХР метилликаонитина (20 нМ) и агониста альфа7-нХР холина (100 мкМ) оказывать однонаправленное действие, а именно - вызывать усиление выброса АХ в ответ на ритмическое раздражение нерва (50 Гц, 1 с), что выражалось в приросте квантового состава ПКП на 25%. При этом аппликация экзогенного холина на фоне действия метилликаонитина не вызвала дополнительных изменений в уровне вызванной секреции АХ. Наблюдаемые эффекты имели пресинаптическую природу, так как параметры МПКП при этом не были затронуты.

Селективный антагонист А1-аденозиновых рецепторов DPCPX (500 нМ) сам по себе не влиял на секрецию АХ, но полностью предотвращал облегчение вызванного выброса АХ, индуцируемое холином.

Таким образом, впервые получены свидетельства наличия ауторегуляторной модуляции выброса АХ через пресинаптические альфа7-нХР в регенерирующих моторных синапсах. Кроме того, продемонстрирована возможность тесного взаимодействия альфа7-нХР и аденозиновых рецепторов А1 типа и/или наличие у них общих внутриклеточных мишеней при обеспечении ауторегуляции выброса АХ в синапсах на ранней стадии их регенерации.

Демаскировка вазоконстрикторного эффекта серотониновых 2В рецепторов и выявление компонентов сигнального пути, опосредующих этот эффект
Миронова Галина Юрьевна, Авдонин Пётр Павлович, Цитрин Евгений

Борисович

ИБР РАН имени Н.К. Кольцова, РФ, Москва

wereshelen@gmail.com

Серотониновые 2В-рецепторы (5-НТ_{2В}R) в норме играют преимущественно роль вазодилататоров, но при некоторых патологических состояниях начинают работать как вазоконстрикторы. Это может быть связано как с экспрессией вазоконстрикторных 5-НТ_{2В}R в гладкомышечных клетках сосудов (ГМК) при патологии, так и с повышением эффективности передачи сигнала от рецепторов на системы мобилизации кальция в ГМК. Целью исследования было проверить, присутствуют ли в норме в сосудах вазоконстрикторные 5-НТ_{2В}R и выявить ключевые компоненты их сигнального пути.

Экспериментальными объектами были ГМК, выделенные из аорты крысы, аорта и брыжеечная артерия крысы. Регистрацию изменений внутриклеточной концентрации кальция и активных форм кислорода (АФК) в ГМК проводили с помощью флуоресцентных зондов Fura-2 и H2DCFDA, измерение сокращения изолированных сосудов – с помощью миографа в изотоническом режиме.

В основе работы лежит гипотеза о том, что вазоконстрикторные 5-НТ_{2В}R экспрессируются в ГМК сосудов, но их функция не проявляется в норме. Методом количественной ПЦР мы продемонстрировали экспрессию 5-НТ_{2В}R в наших экспериментальных системах. Наличие 5-НТ_{2В}R в ГМК подтверждено методами Western-гибридизации и иммунофлуоресценции. Известно, что при ДОКА-солевой гипертензии происходит ингибирование тирозиновых фосфатаз в ГМК сосудов в результате увеличения внутриклеточной концентрации АФК. Для воспроизведения условий, происходящих при патологии, мы использовали Na₃VO₄, механизм действия которого заключается в ингибировании тирозиновых фосфатаз за счет образования АФК. По результатам наших экспериментов Na₃VO₄ значительно увеличивает кальциевый ответ на агонист 5-НТ_{2В}R BW723C86. Этот эффект подавляют ингибитор тирозиновых киназ Src PP2 и антиоксидант N-ацетилцистеин. Антагонист 5-НТ_{2В}R RS127445 также подавляет этот эффект, что говорит о специфичности действия BW723C86. Используя H2DCFDA мы показали, что BW723C86 на фоне Na₃VO₄ потенцирует образование внутриклеточных АФК. В экспериментах на изолированных сосудах был показана демаскировка вазоконстрикторного эффекта BW723C86 на фоне Na₃VO₄.

Таким образом, установлено, что вазоконстрикторные 5-НТ_{2В}R действительно экспрессируются в ГМК сосудов в норме. Подобраны условия демаскировки их сократительного эффекта и показано, что сокращение в ответ на активацию 5-НТ_{2В}R

опосредовано работой тирозиновых Src киназ и АФК. Работа поддержана грантом Российского научного фонда №14-15-01004.

Роль паннексина 1 в регуляции нервно-мышечной передачи у мышей

Митева Анна Степановна.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Anka.miteva@gmail.com

Паннексины (ПН) - семейство гексамерных канальных белков мембран, структурно сходных с коннексинами, - описаны недавно на мембранах скелетных мышечных волокон. Открываясь в ответ на деполяризацию мембраны, ПН высвобождают из мышечных волокон АТФ/аденозин. Остается не ясным, участвуют ли они в создании эффективной концентрации АТФ/аденозина в синаптической щели, необходимой для осуществления пуринергической ауторегуляции секреции ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах? Каков их относительный вклад по сравнению с АТФ, выделяющейся как комедиатор АХ, из пресинаптических везикул и являющейся общепризнанным источником эндогенных АТФ/аденозина, регулирующих секрецию АХ в синапсах. Для решения этого вопроса в данной работе у линии мышей с полным нокаутом гена ПН1 (*Panx1*^{-/-}) методами микроэлектрофизиологии на нервно-мышечных синапсах диафрагмальной мышцы исследовали параметры спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) в ритмических залпах (50 Гц, 1 сек).

У мышей линии *Panx1*^{-/-} не обнаружено достоверных изменений мембранного потенциала мышечных волокон, частоты и амплитуды МПКП, изменений амплитуды ПКП по ходу залпа по сравнению с интактными животными. Если у интактных мышей при блокаде аденозиновых рецепторов А1-типа с помощью блокатора *DCPCX* (100нМ) наблюдали значительный (на 25%), прирост амплитуды ПКП и растормаживание пресинаптических Ca²⁺-каналов L-типа, то у мышей линии *Panx1*^{-/-} *DCPCX* не вызвал прироста амплитуды ПКП и растормаживания Ca-каналов L-типа. Это означает, что в отсутствие ПН1 и высвобождения мышечных АТФ и аденозина, концентрация эндогенного аденозина в щели оказывается ниже уровня, необходимого для осуществления пресинаптического торможения секреции АХ через А1-рецепторы терминалей синапсов. Полученные данные свидетельствуют о падении концентрационного профиля и эндогенной АТФ как основного продуцента аденозина в нервно-мышечных синапсах при исчезновении ПН1 у мышей. Таким образом, впервые показано, что не везикулярная (пресинаптически секретируемая) АТФ, но миогенные АТФ/аденозин, продуцируемые при активности мышечных ПН1, играют главную роль в осуществлении пуринергического аденозинового торможения секреции АХ в моторных синапсах мыши.

Влияние экстракта плаценты на метаболический и гормональный статус коров в послеродовой период

Митяшова Ольга Сергеевна

*Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства
имени академика Л.К. Эрнста, Россия, Подольск
mityashova_o@mail.ru*

В ранний послеродовой период обмен веществ у молочных коров характеризуется катаболической направленностью, что приводит к нарушению у них многих физиологических функций, в том числе репродуктивной. Одним из подходов к решению этой проблемы является использование биостимуляторов, которые оказывают модулирующее действие на иммунную, метаболическую и эндокринную системы. Целью представленного исследования было изучить влияние экстракта плаценты на метаболический и гормональный статус коров в послеродовой период. Животным опытной группы двукратно вводили 20 мл экстракта плаценты в область шеи: за 3-14 дней до родов и в день родов; контрольным животным по этой же схеме вводили физиологический раствор. Перед обработкой и после обработки (на 3-5-й, 20-25-й и 50-60-й дни после родов) у животных была взята кровь для биохимического анализа и определения содержания половых стероидных гормонов методом ИФА. Обработка коров экстрактом плаценты обуславливала различия в динамике изменений ряда биохимических и эндокринных показателей в послеродовой период. Повышение ($p < 0,001$) содержания в крови общего белка (на 24,9%) и его глобулиновой фракции (на 51,8%) наблюдалось на 20-25-й день после родов только у обработанных животных. В течение исследуемого периода возрастание сывороточной активности АЛТ было более выраженным в опытной группе, тогда как возрастание соответствующей активности АСТ было заметным только в контрольной группе. Содержание холестерина в крови животных, обработанных экстрактом плаценты, сохранялось на одном уровне, а в контроле оно было пониженным на 33% ($p < 0,05$) с 3-5-го по 20-25-й день после родов. На 20-25-й день концентрация прогестерона в крови коров опытной группы была на 57,7% ниже, чем в контроле ($p < 0,05$). Через 50-60 дней после родов содержание прогестерона в крови обработанных животных резко возрастало и достигало $16,6 \pm 4,2$ нмоль/л (против $4,4 \pm 2,3$ нмоль/л в контроле, $p < 0,05$). Таким образом, при предварительном введении экстракт плаценты оказывает модулирующее влияние на метаболическое состояние коров в послеродовой период и вызывает повышение лютеальной активности яичников, что может свидетельствовать о стимуляции выхода животных из состояния послеродового анэструса.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (тема 19.№0600-2014-0014.13).

Пептид - агонист PAR1 демонстрирует протекторный эффект при фотоиндуцированной ишемии мозга подобно активированному протеину С
Молчанова Т.А.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
tatyana.molchanova2012@yandex.ru*

Протеазы системы гемостаза играют ключевую роль в патогенезе повреждения мозга при всех типах инсульта - основной современной медико-биологической проблемы. Известно, что активированный протеин С (АПС) через рецептор, активируемый

протеазами 1-го типа (ПАР1), демонстрирует протекторное и противовоспалительное действие. АПС активирует ПАР1 рецептор, расщепляя N-конец рецептора по Arg46. Новый «привязанный» лиганд взаимодействует со второй внеклеточной петлей и активирует рецептор. Активация ПАР может осуществляться посредством пептидов, последовательность которых соответствует «привязанному» лиганду. Поэтому изучение действия агонистов ПАР при инсультных повреждениях актуально как для фундаментальной, так и для клинической физиологии.

Эксперименты были выполнены на беспородных крысах-самцах. Моделирование инсульта осуществляли с помощью фотоиндуцированного тромбоза сосудов сенсомоторной коры. Степень повреждения мозга оценивали морфометрически (с использованием магнитно-резонансной томографии (МРТ)) и с помощью модифицированного поведенческого сенсомоторного теста «Стимулирование конечностей».

Согласно данным МРТ, через 24 часа после фотоиндуцированной ишемии мозга наблюдается увеличение объема поврежденного полушария на 15% по отношению к контрлатеральному интактному полушарию, что свидетельствует о развитии отёка в области повреждения. Внутрижелудочковое введение АПС (35мкг/кг) через 20 минут после фототромбоза снижало развитие отёка мозга по сравнению с инъекцией физраствора на 9,1%. Используемая модель ишемии приводила к развитию выраженного неврологического дефицита через сутки после повреждения. По 12-бальной шкале оценивали состояние сенсомоторной реакции животных во всех исследуемых группах. У интактной группы животных среднее количество баллов составило 12, что свидетельствует об отсутствии сенсомоторного нарушения, в то время как фотоиндуцированная ишемия через 24 часа приводила к функциональному нарушению контрлатеральной конечности, средняя величина в рамках данной группы составила 6 баллов. Центральное введение агонистов ПАР1 - АПС и его пептидного аналога приводило к стабилизации неврологического статуса животных после ишемии, повышая результаты сенсомоторного теста до 9 ± 1 и 8 ± 1 баллов, соответственно. Таким образом, впервые показано нейропротекторное действие нового пептида – агониста ПАР, который подобно АПС в модели фотоиндуцированной ишемии приводит к улучшению неврологического статуса и может служить основой для синтеза нового класса препаратов постинсультной терапии.

Синтез норадреналина в мозге, надпочечниках и органе Цукеркандля в онтогенезе у крыс

Муртазина Алия Рустемовна

Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва

Aliya_mr89@mail.ru

Исследование направлено на изучение синтеза норадреналина (НА) в мозге, надпочечниках и органе Цукеркандля (ОЦ) в перинатальном периоде развития у крыс, когда все эти органы могут быть источниками НА в общей системе циркуляции. В этот период онтогенеза НА может оказывать морфогенетическое действие как на периферические, так и центральные органы-мишени. В качестве показателей, характеризующих синтез НА, мы рассматривали два фермента, участвующих в его синтезе, тирозингидроксилазу (ТГ) и дофамин-бета-гидроксилазу (ДБГ).

Цель данной работы – изучение содержания и уровня экспрессии мРНК белков ферментов синтеза НА в органах-источниках НА в перинатальном периоде онтогенеза.

Объектом исследования были интактные крысы популяции Вистар на 18-й день пренатального периода (Э18), Э21, 3-й день постнатальной жизни (ПЗ), П7, П15, П30. Содержание белков ТГ и ДБГ определяли методом Вестерн блоттинга, уровень мРНК ТГ и ДБГ определяли с помощью ПЦР в реальном времени.

Показано, что в надпочечниках наблюдается значительный рост мРНК ТГ и ДБГ к ПЗ и далее их уровень снижается. Количество же белков увеличивается в течение первой недели жизни и далее не меняется. В ОЦ так же, как и в надпочечниках, происходит рост уровня мРНК и содержания белков в первую неделю жизни, и затем наблюдается их снижение. В мозге небольшое снижение мРНК ТГ прослеживается к Э21, потом её уровень остается неизменным. Экспрессия мРНК ДБГ практически не меняется, снижаясь лишь с П15 по П30, содержание же белка ДБГ максимально в пренатальном периоде и уменьшается к 30 дню жизни. Результаты проведенных исследований выявили корреляцию между экспрессией мРНК и содержанием белков ферментов синтеза НА в надпочечниках и ОЦ, но не в мозге.

Таким образом, синтез НА в исследованных органах изменяется по мере развития организма: максимальное содержание ферментов синтеза НА в мозге обнаруживается в пренатальном периоде, тогда как на периферии ещё и в течение первой недели жизни.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-15-01122.

Исследование физического развития и динамики становления моторных рефлексов крысят с фетальным вальпроатным синдромом в раннем постнатальном периоде

Нижарадзе М.П., Гедзун В.Р.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва*

mishan8@ya.ru

Расстройства аутистического спектра (РАС) это группа заболеваний, характеризующаяся широким спектром морфо-физиологических и психо-эмоциональных нарушений. Для моделирования РАС применяется модель фетального вальпроатного синдрома (ФВС), в которой самкам крыс на 12 день беременности вводится вальпроатная кислота (внутрибрюшинно, в концентрации 600 мг/кг). В нашей работе впервые была проведена оценка раннего постнатального развития крысят в модели ФВС (1-20 ПНД), а также влияния хронического введения пептида селанк (интраназально, в дозе 0,1 мг/кг с 1 по 14 ПНД) на раннее физическое развитие крысят и динамику становления моторных рефлексов в норме и при ФВС. В этот период у крысят происходит становление моторных рефлексов и параметров физического развития. У человека этот период соответствует поздним этапам эмбриогенеза.

Оценка физических параметров развития крысят (1-20 ПНД), включала определение времени отхождения ушей, открытие слуховых проходов и глаз, прорезывание зубов, а также измерение длины и ширины головы, длины хвоста, массы тела. Исследовали ряд моторных рефлексов: переворот со спины на лапы (1-4 ПНД), отрицательный геотаксис (на поверхностях, расположенных под углом 30° и 45° к земле, 5-15 ПНД), выход из круга – «gait» (10-20 ПНД).

По параметрам длина и ширина головы, масса тела статистически значимых различий между группами обнаружено не было. Показано, что крысы с ФВС (группы ВПК и ВПК+селанк), но не группа «селанк», отстают от показателей группы «контроль» в развитие хвоста (тератогенный эффект ВПК), зубов и ушей. В тесте «переворот» (1-2 ПНД) в группе «селанк» показано статистически значимое улучшение выполнение рефлекторного переворачивания со спины на живот, по сравнению с группой «контроль». Отмечено статистически значимое снижение моторной активности крысят в группах с ФВС в тесте геотаксис 30° (8 ПНД) и 45° (11 ПНД). Эффектов селанка и корректирующего влияния селанка на эти моторные реакции у крысят с ФВС выявлено не было. В тесте «gaît» различий между экспериментальными группами обнаружено не было.

Работа была проведена при поддержке гранта РФФИ 15-04-05104.

Изменения параметров variability сердечного ритма у студентов с разными типами биоритмов под влиянием информационной нагрузки

Павленко Снежанна Ивановна

ФГАОУ ВО Самарский национальный исследовательский университет

имени академика С.П. Королева, Россия, Самара

pavlenko.snezhanna@mail.ru

Важной задачей физиологии человека является изучение хронотипической зависимости динамики variability сердечного ритма (ВСР) у студентов в процессе учебной деятельности и сопутствующего ей информационного стресса, что актуально в плане профилактики и сохранения их здоровья.

Цель исследования состояла в анализе изменений параметров ВСР у студентов с разными типами биоритмов в условиях информационной нагрузки.

Студенты были разделены на 3 группы: «жаворонки» (n=19), «голуби» (n=46) и «совы» (n=29). ВСР регистрировали методом пульсоксиметрии до и сразу после выполнения информационной нагрузки утром с 7.30 до 9.00 ч, днем с 13.00 до 15.00 ч и вечером с 18.00 до 19.00 ч. Анализировали изменения индексов активности симпатического (СИМ) и парасимпатического (ПАР) отделов вегетативной нервной системы, индекса Баевского (ИБ), спектральной мощности колебаний кардиоритма в диапазоне очень низких (VLF), низких (LF) и высоких (HF) частот, общей спектральной мощности (Total), индекса LF/HF.

Установлено, что у студентов «жаворонков» выполнение информационной нагрузки утром вызывало увеличение LF на 35,1%, днем рост HF на 26,7%, вечером снижение ИБ на 19,7%. У «голубей» при работе утром достоверно увеличивались все спектральные параметры ВСР в среднем на 37,3%, но при этом уменьшались величины СИМ и ИБ. Нагрузка, выполняемая днем, вызывала у них рост только LF/HF на 27,2%. Вечером у «голубей» наблюдался рост ПАР, Total, VLF и HF в среднем на 27,1% и снижение СИМ и ИБ в среднем на 14,3%. У «сов» в утреннее время изменения ВСР проявлялись увеличением ПАР (на 21,1%) и HF (на 38,3%), уменьшением СИМ (на 43,1%) и ИБ (на 27,3%). Информационная нагрузка днем вызывала у них преимущественные изменения таких параметров, как LF, Total и LF/HF (увеличение в среднем на 32,2%). В вечернее время у «сов» наблюдался рост ПАР, индекса LF/HF на 19,3% и 36,3% в сочетании со снижением VLF, СИМ и ИБ на 18,5%, 41,1% и 14,5% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что студентам «голубям» свойственна наиболее оптимальная синхронизация кардиоритма с внешними ритμοподавателями, что отражает их более широкие возможности адаптации к информационным нагрузкам в разные периоды дня, чем у «жаворонков» и «сов».

Влияние парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе на степень развития легочной артериальной гипертензии в экспериментах на крысах популяции Wistar

Панькова Надежда Владимировна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

nadezhda.pankova.nnov@gmail.com

Легочная артериальная гипертензия характеризуется хроническим повышением систолического правожелудочкового давления (СПЖД) и возникает при длительном снижении напряжения кислорода в крови. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния величины парциального давления кислорода в гипобарической гипоксической камере (13%, 10%) на степень развития гипоксической формы легочной артериальной гипертензии (ГЛАГ) у гонадоэктомированных самок и самцов крыс популяции Wistar.

В 2х-месячном возрасте крыс подвергали билатеральной гонадоэктомию. Спустя 2 недели животным начинали подкожно вводить пропиленгликоль в течение 28 дней. Через 2 недели от начала введения веществ животных подвергали хроническому действию гипобарической гипоксии при постоянном содержании кислорода в камере равной 10%, для одной части животных, и 13% O₂ для другой в течение 2 недель по 10 часов в день, что приводило к развитию ГЛАГ. Третья группа животных на время гипоксии помещалась в виварные условия. После этого у наркотизированных животных измеряли СПЖД, а в изолированных перфузируемых легочных артериях 3 порядка реактивность на серотонин (Ст).

У животных, подвергавшихся действию хронической гипоксии наблюдали достоверное увеличение СПЖД у всех групп животных. Однако, оно зависело от уровня содержания кислорода в камере. Увеличение СПЖД у самок с O₂=10% по сравнению с группой O₂=13% возросло на 33%. У самцов такой реакции не наблюдалось. Кроме того у самок с 10% O₂ СПЖД возросло на 32% по сравнению с соответствующей группой самцов (p<0,05). Для анализа возможных механизмов изменения артериального давления в малом круге кровообращения в зависимости от степени гипоксии изучали реактивность легочных артерий на серотонин. Влияние степени гипоксии на реактивность изолированных сосудов у самцов выявлено не было. У самок 13% гипоксия привела к уменьшению ответа на Ст в концентрации 10⁻⁷ М (с 1,3±0,2 мм. рт. ст. у 21% O₂ до 0,56±0,19 у 13% O₂ p<0,05). Увеличение степени гипоксии до 10% у самок характеризовалось усилением ответа на Ст в концентрации (10⁻⁵М с 9,95±2,1мм рт. ст. у 13% O₂ до 28±7,3 у 10% O₂ p<0,05).

Таким образом, увеличение степени гипоксии провоцирует увеличение степени тяжести протекания ГЛАГ у самок, что сопровождается увеличением ответа на сосудосуживающие факторы в изолированных легочных сосудах.

Исследование роли внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) как симпатического комедиатора в сердце крысы

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
ncklprakhomov@mail.ru*

В настоящее время внеклеточный никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) рассматривается как нейрогуморальный фактор. Так показано, что НАД⁺ может высвобождаться из нервных окончаний совместно с норадреналином (НА) и регулировать сократительную активность гладкомышечных клеток. Установлено, что НАД⁺ снижает сократимость желудочкового миокарда сердца крысы, вызывает снижение длительности потенциалов действия в желудочках и предсердиях. Тем не менее, остается не исследованной роль экзогенного НАД⁺ как симпатического комедиатора в сердце, а также его способность влиять на динамику цитоплазматического кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в кардиомиоцитах в норме и при адренергической стимуляции.

В данной работе оценивали влияние НАД⁺ на сократительную активность сердца, а также на динамику $[Ca^{2+}]_i$ в контроле и при действии НА. Для регистрации сократительной активности осуществляли нормоксическую (T=37°C) ретроградную перфузию изолированного по Лангендорфу сердца крысы при навязанном ритме. Динамику изменения $[Ca^{2+}]_i$ в энзиматически изолированных кардиомиоцитах оценивали с помощью метода кальциевого имиджинга (в качестве флюоресцентного зонда использовали Fluo-4AM). Все эксперименты выполнены с использованием самцов крыс стока Wistar (3-4 мес, 250-300 г).

В контрольных условиях НАД⁺ (10 μ M, n=10, p<0.05) вызывал снижение развиваемого давления, максимальной скорости сокращения и расслабления желудочкового миокарда. Однако, НАД⁺ (10 μ M) не оказывал значимого влияния на сократительную активность при действии на фоне НА (10 μ M, n=8). При самостоятельном действии НА, при действии НА совместно с НАД⁺ развиваемое давление, максимальная скорость сокращения, расслабления составляли 188.2±20.3 мм.рт.ст, 159.2 мм.рт.ст, 6998±1117 мм.рт.ст/с 5627±547 мм.рт.ст/с и 5190 мм.рт.ст/с, 4549±430.9 мм.рт.ст/с соответственно (везде p>0.05). НАД⁺ (10 μ M) вызывал существенное снижение систолического уровня $[Ca^{2+}]_i$ в желудочковых кардиомиоцитах (n=5, p<0.05). Однако, статистически значимого изменения $[Ca^{2+}]_i$ при действии НАД⁺ на фоне НА выявить не удалось.

Как известно, положительные инотропные эффекты, развивающиеся в сердце при симпатической стимуляции, связаны с увеличением $[Ca^{2+}]_i$. Внеклеточный НАД⁺ может оказывать влияние на сократимость сердца крысы, вероятно, за счет подавления высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума. Однако, способность НАД⁺ влиять на $[Ca^{2+}]_i$ при действии НА, и, таким образом, ограничивать эффекты симпатической стимуляции в сердце, остается не выявленной.

Перераспределение жидкости в теле мышей после антиортостатического вывешивания разной продолжительности

Попова Анфиса Сергеевна^{1,2}, Лагерева Евгения Александровна²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

² Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

popova.anfisa@gmail.com

Введение. Гравитационный фактор играет большую роль в нормальном функционировании сердечнососудистой системы. Пребывание в условиях микрогравитации вызывает адаптивные изменения деятельности сердечно-сосудистой системы, затрагивающие, в том числе, микроциркуляцию, водный обмен, состав и объем крови. Известно, что в условиях невесомости у человека исчезает разница в гидростатическом давлении в разных точках аорты, происходит перераспределение крови в краниальном направлении, что приводит к увеличению объема межклеточной жидкости в передней части тела. Именно перераспределение жидкости может являться одной из причин последующих физиологических и анатомических изменений. В тоже время у мышей гидростатический градиент практически отсутствует из-за их малых размеров и положения тела, однако 30-суточный космический полет вызывает выраженные изменения в работе сердечно-сосудистой системы мышей, сходные с наблюдаемыми у человека (тахикардия и повышенная пульсовая стоимость бега). Можно предположить, что именно микроциркуляторные процессы, мало зависящие от размера организма, являются «мишенью» действия микрогравитации.

Цель работы. Оценить перераспределение жидкости в теле мышей по влажности различных тканей, изменение объема циркулирующей крови и гематологических параметров при моделировании эффектов микрогравитации путем антиортостатической гипокинезии (АНОГ).

Материалы и методы. Самцов мышей линии Valb/C вывешивали за основание хвоста под углом 30° к полу на срок 0, 12, 24, 48, 72 и 168 часов. Влажность ткани слюнных желез, мозга, почек, легких, придаточного аппарата, мышц плеча и мышц голени определяли по разности сухой и влажной массы. Объем циркулирующей крови определяли по разведению красителя (синего Эванса). Гематокрит определяли при помощи гематокритной центрифуги, остальные гематологические параметры - при помощи автоматического анализатора.

Результаты. Влажность тканей мозга и легких вывешенных мышей практически не изменялась. Влажность почек, мышц голени и мышц плеча была снижена в течение первых трех дней и восстанавливалась - к седьмому дню вывешивания. Влажность слюнных желез и придаточного аппарата после снижения в первые сутки АНОГ, возрастала, и к 7 суткам превышала значения до вывешивания. Максимальное увеличение гематокрита и количества эритроцитов происходило на 3 сутки вывешивания. Объем крови и плазмы увеличивается на 1 сутки вывешивания, затем снижается к 3 суткам.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о выраженном перераспределении жидкости у мышей при моделировании эффектов микрогравитации АНОГ, что, с учетом их миниатюрного размера и положения тела этих животных не может быть объяснено изменением гидростатического давления.

Участие калиевых каналов мембраны в механизмах действия АТФ на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы

**Рыдченко Виктория Сергеевна, Смазлий Людмила Вячеславовна,
Гусакова Светлана Валерьевна**

*Сибирский государственный медицинский университет, Россия, Томск
ryd4enkoviknoriya@mail.ru*

Важную роль в регуляции сосудистого тонуса играют внеклеточные пурины (АТФ, АДФ). АТФ в зависимости от условий может оказывать как констрикторное, так и дилаторное действие на стенку кровеносного сосуда. В связи с этим целью работы было изучить влияние АТФ на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток, вызванную деполяризацией мембран гиперкалиевым раствором и активацией α 1-адренорецепторов, а также роль калиевых каналов мембраны в механизмах его действия.

Объектом исследования послужили изолированные сегменты грудного отдела аорты крыс линии Wistar. Сократительную активность гладких мышц исследовали методом механографии с использованием механографической установки Myobath II (Германия). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от контрольного сокращения на действие гиперкалиевого раствора (30 мМ КСl) или фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ), которые принимали за 100%.

На фоне сокращения гладкомышечного сегмента, вызванного инкубацией в 30 мМ КСl, АТФ в концентрациях 1-100 мкМ приводил к небольшому увеличению механического напряжения сегментов, а при действии 500 мкМ и 1000 мкМ АТФ - их расслаблению. Блокатор потенциал-зависимых и кальций-активируемых калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА, 10 мМ) и блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламид (ГБ, 10 мкМ) не оказывали статистически значимого влияния на действие АТФ.

На фоне ФЭ-индуцированного сокращения сегментов аорты крысы АТФ в концентрациях 1-1000 мкМ приводил к расслаблению гладкомышечных сегментов аорты крысы как с сохраненным эндотелием, так и деэндотелизированных ($p < 0.05$), при этом величина расслабления деэндотелизированных сегментов была достоверно выше ($p < 0.05$). Добавление ТЭА (10 мМ) на фоне ФЭ устраняло релаксирующее действие 1-100 мкМ АТФ, и, напротив, приводило к увеличению механического напряжения сегментов ($p < 0.05$). ГБ (10 мкМ) снижал величину АТФ-индуцированного расслабления сегментов, предсокращенных ФЭ, при сохраненном эндотелии и полностью устранял расслабляющее действие АТФ в деэндотелизированных сегментах ($p < 0.05$).

Исходя из полученных данных можно заключить, что действие АТФ на гладкомышечные сегменты аорты крысы, предсокращенные ФЭ, но не 30 КСl зависит от потенциал-зависимых и/или кальций-активируемых, а также АТФ-чувствительных калиевых каналов.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№16-34-00262\16 от 27.01.2016).

Изменение стероидогенной активности фолликулярных тканей в процессе репродуктивного старения домашней курицы

Смекалова Араксия Ашотовна

*Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства
имени академика Л.К. Эрнста, Россия, Подольск
araksia86@mail.ru*

Фертильность самок ухудшается с возрастом, при этом происходит прогрессирующее снижение качества фолликулов, которое обуславливает различные эндокринные расстройства. В яичнике домашней курицы рано иницируются процессы старения, что приводит к уменьшению интенсивности яйцекладки, связанному с увеличением интервала между овуляциями и с нарушением овуляторного процесса. В настоящей работе было проведено сравнительное исследование стероидогенной активности тканей преовуляторных фолликулов у молодых кур (в возрасте 25-35 недель) и у кур с регулярными ановуляторными циклами (в возрасте старше 70 недель). Гранулезную и текальную ткань выделяли из двух самых больших преовуляторных фолликулов (F1 и F2) и культивировали совместно в течение 18 ч. После культивирования в средах определяли концентрацию половых стероидных гормонов методом ИФА. У кур разного возраста были выявлены существенные различия в способности фолликулярных тканей продуцировать *in vitro* половые стероидные гормоны. У птиц с регулярными ановуляторными циклами наблюдался более низкий уровень базальной секреции прогестерона гранулезной тканью F2 фолликулов, чем у молодых птиц (86 ± 11 против 128 ± 16 нг на мг белка, $p < 0,05$). Кроме того, у репродуктивно постаревших кур лютеинизирующий гормон (ЛГ) не стимулировал секрецию прогестерона клетками гранулезы из F2 фолликулов. У молодых кур базальная и ЛГ-индуцированная продукция тестостерона текальной тканью из F2 фолликулов была значительно выше таковой из F1 фолликулов ($1,39 \pm 0,29$ против $0,72 \pm 0,13$ нг/мг белка и $2,23 \pm 0,36$ против $1,35 \pm 0,18$ нг/мг белка соответственно, $p < 0,05$). В то же время у кур старшего возраста такие различия не были выявлены. Способность текальной ткани F1 фолликулов продуцировать эстрадиол- 17β у постаревших птиц в целом была повышенной ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичной способностью, обнаруженной у более молодых птиц. Полученные данные показывают, что процессы старения влияют на стероидогенную активность тканей двух самых больших преовуляторных фолликулов кур. Возрастные модификации затрагивают как способность фолликулярных клеток продуцировать гормоны, так и чувствительность клеток к действию ЛГ, стимулирующему стероидогенез. При этом изменения в продукции прогестерона и тестостерона фолликулярными тканями могут быть связаны с повышением частоты ановуляторных циклов у постаревших птиц.

Медиодорзальное ядро таламуса как мишень для противоэпилептической стимуляции при смешанных формах эпилепсии

Солодков Роман Викторович, Зыбина Анна Михайловна,

Куличенкова Ксения Николаевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва*

rommets@gmail.com

Препараты, купирующие лимбические судороги, могут провоцировать абсансные приступы, поэтому терапия смешанных форм припадков остается одной из актуальных проблем. Поиск альтернативных методов лечения привело к развитию нового направления – лечебной электрической стимуляции мозга. При абсансной эпилепсии эпилептическая активность возникает в фокусе, находящемся в соматосенсорной коре, и быстро вовлекает таламус за счёт кортико-таламических связей. Исследования последних лет предполагают вовлеченность медиодорзального ядра таламуса в лимбические судороги, электростимуляция этого ядра эффективна при купировании височной или лимбической эпилепсии. В этой связи работа посвящена исследованию противоэпилептического действия электрической стимуляции медиодорзального ядра таламуса на модели абсансной эпилепсии у животных и поиска параметров стимуляции.

В работе использованы самцы крыс линии WAG/Rij (n=8) с абсансной эпилепсией. Наркотизированным (хлоралгидрат 400 мг/кг) крысам стереотаксически унилатерально вживляли стимулирующие биполярные электроды в медиодорзальное ядро таламуса и записывающие униполярные электроды в кору большого полушария. Проводили электростимуляцию медиодорзального ядра таламуса во время генерации SWD. Стимуляцию ядра проводили в режиме низкочастотной (10 Гц) и высокочастотной (130 Гц) стимуляций.

Частота генерации пик-волновых разрядов у крыс в течение эксперимента не менялась и составляла 8-11 Гц. Результаты эксперимента показали, что низкочастотная электростимуляция при 10 Гц достоверно ($p < 0.05$) снижает как количество, так и продолжительность пик-волновых разрядов в течение первого часа стимуляции. Эффект сохраняется во время второго часа регистрации ЭЭГ и через 24 часа уже без стимуляции ядра. При этом высокочастотная стимуляция 130 Гц показала более эффективное подавление пик-волновых разрядов количественно по сравнению с низкочастотной стимуляцией. Купирующий эффект также сохранялся во время второго часа регистрации ЭЭГ и через 24 часа уже без стимуляции ядра.

Таким образом, нами было показано, что кратковременная стимуляция медиодорзального ядра в момент начала развития пик-волновых разрядов может успешно прерывать приступ при стимуляции в диапазоне 10-130 Гц, что согласуется с параметрами стимуляции для прерывания лимбических приступов и может являться потенциальной мишенью для стимуляции при смешанных формах эпилепсии.

Авторы выражают благодарность научному руководителю, доценту, к.б.н. Кенуль Расимовне Аббасовой.

Циркадианные изменения метаболической активности печени в условиях хемотрессорного воздействия морских свинок

Срослова Галина Алексеевна

*Волгоградский государственный университет, институт естественных наук,
Россия, Волгоград
g.a.kudryavtseva@mail.ru*

Согласно литературным данным, в качестве диагностических критериев оценки функционального состояния организма используется уровень общей неспецифической реактивности организма (УОНРО), качественно и количественно отражающего степень индивидуальной чувствительности к различным экзогенным воздействиям [1]. Ранее было показано, что у животных с различным УОНРО, оцениваемого по показателю порога болевой чувствительности и коррелирующего со многими физиологическими показателями [2], отличается реакция организма на стрессорное воздействие. Целью данного исследования было изучить особенности метаболической активности печени у морских свинок с различными показателями УОНРО в ответ на хемотрессорное воздействие в динамике в течение суток. В качестве сильного стрессора вводили липополисахарид *S. Typhimurium* (Sigma, USA) в дозе 0,5 мг/кг массы внутрибрюшинно, что по токсикологической характеристике производителя соответствует LD₁₀. УОНРО определяли по порогу болевой чувствительности (ПБЧ) с использованием специального «электропола» со стандартизированной управляемой подачей разницы потенциалов на конечности животных от 5 до 30 В с шагом в 0,5 В [2]. Было отобрано по 15 особей с высоким (ПБЧ было менее 15,5 В), средним (ПБЧ в пределах 11,5 – 20,8 В) и низким (ПБЧ 20,9 В и выше) УОНРО. В гомогенатах печени контрольных и стрессированных животных в различное время суток (9:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00) определяли содержание липидов, продуктов их перекисного окисления, активность двух ферментов межучточного обмена печени: ацилазы и ЛХАТ (лецитин: холестерол-ацилтрансферазы) в различное время суток. Было показано, что во всех группах и на каждом временном интервале был зарегистрирован положительный ΔT_{30} , но величина подъема температуры зависела как от времени введения токсина, так и от УОНРО подопытных животных. У морских свинок с высоким УОНРО она составляла в среднем $1,37 \pm 0,13$ °С, у животных со средним УОНРО - $1,34 \pm 0,12$ °С, с низким УОНРО - $1,11 \pm 0,09$ °С.

Циркадианный ритм ΔT_{30} имел монофазный характер: в утренние часы регистрировались умеренная реакция, акрофаза ΔT_{30} приходилась во всех группах на период с 12.00 до 15.00, затем регистрировалось снижение температурной реакции. Батифазы выявлены для животных с высоким и средним УОНРО в 21.00, у животных с низким УОНРО – в 18.00 (для них был характерен небольшой подъем ΔT_{30} к 21.00).

Таким образом, приведенные результаты исследования показали, что УОНРО в большей степени влияет на величину температурной реакции в ответ на введение ЛПС, нежели суточный биоритм. Для животных с высоким и средним УОНРО характерны примерно на треть более высокие значения ΔT_{30} , в сравнении с животными с низким УОНРО. Только для животных с низким УОНРО характерен вечерний подъем температурной чувствительности к введению ЛПС

***Отставленные эффекты хронического неонатального введения аналога
АВП(6-9) – Ас-D-MPRG на поведение крыс разных возрастов***

Стаханова Анна Андреевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
anna.stahanova@inbox.ru*

С-концевая последовательность аргинин-вазопрессина является функционально важным участком для проявления поведенческих эффектов. Выяснилось, что аналог АВП(6-9) – Ас-D-Met-Pro-Arg-Gly-NH₂– при интраназальном введении обладает биологической активностью, превосходящей сам прототип.

В данной работе исследовались отставленные эффекты хронического неонатального введения Ас-D-MPRG детенышам белых крыс на ориентировочно-исследовательское поведение (ОИР) и уровень тревожности животных. Каждый выводок делили на 2 части: опытной водили тетрапептид в дозе 1 и 10 мкг/кг, контрольной – эквивалентный объем дистиллированной воды. Исследования проводили у животных трех возрастных групп: 1-ая возрастная группа – 35-39 дней жизни (препубертатный период), 2-ая возрастная группа – 49-53 дня (пубертатный период) и 3-ья возрастная группа – 63-67 дней (половозрелые животные). Уровень ОИР и тревожности исследовали в тестах «открытое поле» (ОП) (бесстрессорная и стрессогенная модификации), «норковая камера» (НК) и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).

У животных 1-ой возрастной группы в тесте ПКЛ наблюдалось достоверное увеличение количества стоек, увеличение переходов из отсека в отсек и снижение груминга при введении препарата в обеих дозах. В тесте НК наблюдалось достоверное увеличение обследованных отверстий при использовании обеих доз препарата. В тесте ОП в стрессогенной модификации наблюдалось снижение латентного периода и величины пробега животных.

У животных 2-ой возрастной группы не было выявлено значимых различий в тесте ПКЛ. В тесте НК наблюдалось достоверное увеличение пробега и количества обследованных отверстий только при введении дозы 1 мкг/кг. Эта же доза оказалась эффективнее в стрессогенной модификации теста ОП. Достоверное увеличение длины пробега и числа стоек, наиболее выраженное на 2-ой минуте регистрации (данный эффект наиболее выражен у самок).

У животных 3-ей возрастной группы в тесте ПКЛ наблюдалось достоверное снижение уровня тревожности, наиболее выраженное у самок только при введении дозы 10 мкг/кг. В стрессогенной модификации теста ОП наблюдалось значимое снижение латентного периода и увеличение суммарного пробега, наиболее выраженное у самцов при использовании дозы 1 мкг/кг.

Таким образом, тетрапептид Ас-D-MPRG действительно обладает отставленным действием, которое зависит от дозы неонатального введения и возраста тестируемых животных.

**Адаптационная динамика функционального состояния организма
первоклассников в начальном периоде обучения.**

Страмцова Анастасия Юрьевна

*Южный Федеральный Университет, Академия биологии и биотехнологии имени
Д.И. Ивановского, кафедра физиологии человека и животных, Россия, Ростов-на-Дону
anastasiya-stramcova@mail.ru*

В соответствии со стратегией ВОЗ мониторинг функциональных резервов организма, донозологическая диагностика на ранних стадиях развития адаптационного процесса и своевременная коррекция функционального состояния рассматриваются в качестве наиболее оптимальной методологии охраны здоровья. В настоящее время одним из самых важных и информативных методов экспресс-оценки функционального состояния различных звеньев вегетативной регуляции и организма в целом является метод анализа вариабельности сердечного ритма

Исследование по изучению динамики функционального состояния организма первоклассника выполнено на базе МБОУ СОШ №24 г. Ростов-на-Дону. Обследование проведено на 3,5,8 неделях обучения. Динамика параметров сердечного ритма оценивалась с помощью специализированного программно-аппаратного комплекса «Варикард 2.51», в положении лежа и при ортостатической пробе в утренние часы.

Результаты исследования динамики функционального состояния младших школьников свидетельствуют о более высоких возможностях адаптации девочек (норма на третьей неделе-31%, на пятой-7,7%, на восьмой-50%), чем их сверстников. У значительного количества девочек на пятой неделе обучения выявлено более высокое, чем в норме, напряжение регуляторных систем (донозологическое состояние) - 69%, на фоне умеренного преобладания симпатической нервной системы. Количество девочек с преморбидным функциональным состоянием, характеризующимся снижением функциональных возможностей организма, в динамике обследования уменьшается (31%,23%,17%). У мальчиков физиологическая норма выявлена только на третьей (25%) и восьмой (25%) неделях. Во все периоды обследования большая часть первоклассников обоего пола имеют донозологическое функциональное состояние организма (50%). На всех этапах обследования половые различия по показателям частоты сердечных сокращений (ЧСС) недостоверны. На пятой неделе адаптации у всех обследованных детей ЧСС имеет тенденцию к повышению и свидетельствует о напряжении механизмов адаптации. Девочки обследуемой группы адаптируются к учебному процессу быстрее, чем мальчики, о чем свидетельствуют достоверные снижения пульса в ортостазе ($t=2,87$, $p<0.01$) от пятой к восьмой неделе обследования. Снижение реактивности регуляторных механизмов отражает наступление адаптации организма девочек к учебному процессу. Школьников с резким снижением функциональных возможностей организма в связи с нарушением механизмов компенсации (срыв адаптации) не выявлено.

Данные, полученные нами в ходе исследования, представляют собой значительный практический интерес, поскольку выявляют напряжение механизмов адаптации у первоклассников обоего пола на пятой неделе обучения, что требует особо осторожного отношения к дозированию объема учебной и физической нагрузок в этот период.

Особенности миграции введенных в пространство Меккеля мезенхимальных клеток после локального повреждения мозжечка

Стукач Юлия Павловна

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Беларусь, Минск
stukachyulya@gmail.com*

Способы коррекции последствий травм головного мозга разрабатываются во всем мире. Современным вариантом терапии является применение стволовых клеток для восстановления поврежденных нейронных сетей и нарушения при этом функций мозга. Внутривенное или в поврежденный участок мозга введение стволовых клеток сопряжено с естественным распределением клеток с током крови в организме или в тканях органа, что сопровождается уменьшением их количества в зоне повреждения. Для решения этой задачи предложен альтернативный путь доставки стволовых клеток – введение в рецептивные поля черепно-мозговых нервов. Основа гипотезы: изучить особенности миграции мезенхимальных клеток в головном мозге после их введения в пространство Меккеля. Мезенхимальные клетки выделяли из жировой ткани взрослых крыс и культивировали в питательной среде DMEM (Sigma, Германия) на протяжении 7 дней. *Ex tempore* готовили клеточную суспензию с концентрацией 900 тыс. клеток в 1 мл (по 45 тыс. клеток на животное). Сформированы три группы по 7 животных: «Односторонняя травма, ипсилатеральное введение МСК», «Односторонняя травма, контралатеральное введение МСК», «Двусторонняя травма, одностороннее введение МСК». Аспирацию участка мозжечка объемом 2-3 мм³ (2,5 мм латеральнее средней линии, 1,5 мм каудальнее лямбды, на 5,0 мм в глубину от поверхности мозга) с одной или двух сторон проводили на анестезированных крысах. Через 10 мин животным в пространство Меккеля вводили 50 мкл суспензии мезенхимальных клеток. Продольные срезы мозга (толщина 8 мкм) для флуоресцентной микроскопии получали на криостате на 6 и 9 дни после введения клеток. На шестой и девятый день после имплантации мезенхимальные клетки обнаружены в области повреждения. Причем, у животных с односторонней травмой мозжечка в случае ипсилатерального введения количество флуоресцирующих клеток в очаге поражения превышало число светящихся клеток после их контралатерального введения. При двусторонней травме приоритетность ипсилатерального трейсинга по сравнению с контралатеральным сохраняется. Таким образом, подтверждена гипотеза о наличии ипсилатерального и контралатерального периневрального перемещения мезенхимальных стволовых клеток из пространства Меккеля в заднюю черепную ямку.

Влияние пролактина на биодинамику ионов натрия у самцов крыс в условиях холестаза

Суханова Любовь Егоровна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва
Lyubov-Suh@yandex.ru*

Пролактин является важным регулятором водно-солевого обмена у рыб, тогда как у млекопитающих его роль в этом процессе недостаточно изучена. Цели данной работы заключались в исследовании действия пролактина на биодинамику ионов натрия у самцов крыс и в сравнении реакции самцов и самок на повышенную концентрацию пролактина.

Объектом исследования являлись половозрелые беспородные самцы крыс (200-400г). В работе совместно и по отдельности моделировали два патологических состояния, характеризующихся повышенным уровнем пролактина: обструктивный холестаза и гиперпролактинемия. Для моделирования холестаза проводили перевязку желчного протока, а для моделирования гиперпролактинемии пересаживали гипофиз одной крысы под почечную капсулу другой. С помощью метаболических клеток собирали мочу до и после операции. Концентрацию натрия в моче и сыворотке определяли с помощью набора ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ на спектрофотометре Genesys (Thermo Scientific).. Оценивали изменения потребления воды, диуреза, экскреции и клиренса ионов натрия, сравнивали с аналогичными данными для самок.

У самцов достоверных изменений в суточном потреблении воды, диурезе, экскреции и клиренсе натрия после операций не наблюдалось. Концентрация натрия в моче понизилась у группы с обструктивным холестазом ($n=10$, $p<0,05$), а в группе с гиперпролактинемией понизилась концентрация натрия в сыворотке ($n=5$, $p<0,05$). Достоверных различий между одинаковыми группами у самцов и самок анализ не выявил.

Однако мы предполагаем, что действие пролактина на самцов и самок различается, так как предыдущие исследователи показывали эффект пролактина на самок, а в нашем эксперименте такого эффекта выявлено не было даже при сравнении параметров у каждой конкретной крысы до и после операции. Для окончательного решения вопроса о действии пролактина на натриевый обмен требуется увеличение выборки экспериментальных животных, но предварительно мы делаем вывод о зависимом от пола влиянии пролактина на обмен натрия.

Эффекты интраназальной аппликации клонидина на импульсную активность нейронов вентральных отделов продолговатого мозга

Токальчик Дмитрий Павлович

Институт физиологии НАН Беларуси, Беларусь, Минск

fossil1991@mail.ru

Агонист альфа2-адренорецепторов клонидин широко применяется в экспериментальных исследованиях для анализа взаимодействий центральных и периферических адренергических систем с другими нейромедиаторными системами. Антигипертензивное действие клонидина при его применении в клинической практике имеет выраженный двухфазный характер. Вначале наблюдается кратковременный подъем артериального давления, а затем пролонгированное его снижение. Если первая фаза обусловлена активацией сосудистых альфа-адренорецепторов, то вторая (гипотензивная) фаза связана с процессами в стволе головного мозга. Существуют литературные сведения, подтверждающие существование участков вентральной поверхности продолговатого мозга (ВППМ), при аппликации на которых клонидина наблюдается гипотензивный эффект. В связи с этим предположили, что при введении клонидина в полость носа в силу близости расположения от головного мозга возможно наблюдать доминирование центрального гипотензивного эффекта клонидина. В экспериментах акцентировали внимание на особенности электрической активности нейронов рострального (РВЛ) и каудального (КВЛ) участков ВППМ при интраназальной аппликации альфа2-адреномиметиков. Активность этих структур определяет эффективность активации

симпатических преганглионарных нейронов в спинном мозге, ответственных за формирование периферического сосудистого сопротивления.

Эксперименты проводили в условиях острого опыта на 20-ти наркотизированных внутривенно (30 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана) белых крысах-самцах массой тела 300–350 г. Животных фиксировали в стереотаксическом приборе СЭЖ-5 для регистрации нейронной активности в КВЛ и РВЛ областях ВОПМ до и после интраназального введения 50 мкл 0,1% клонидина.

В КВЛ области ВОПМ зарегистрированы популяции нейронов с высокой и низкой частотами разрядов. Установлена зависимость направленности сдвига электрической активности нейронов ствола головного мозга от исходной частоты их разрядов. После аппликации клонидина на СОПН у нейронов с высокой частотой разрядов (170-240 имп/с) снижается импульсная активность. Нейроны с низкочастотной активностью (3-25 имп/с) демонстрируют возрастание частоты разрядов. Приведенные закономерности подтверждаются в процессе анализа сердечно-сосудистой деятельности и дыхания. Фиксируемые частоты сердечных сокращений и дыхания достоверно снизились. Зарегистрированное ослабление электрической активности высокочастотных нейронов в РВЛ участках ВОПМ свидетельствует об уменьшении активирующих сигналов из ствола головного мозга к симпатическим преганглионарам спинного мозга и о снижении артериального давления.

Исследование влияния острой нормобарической неонатальной гипоксии на физическое развитие и становление моторных рефлексов у детенышей белых крыс

Хухарева Дарья Дмитриевна, Суханова Юлия Алексеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

7carcharodon@gmail.com

Перинатальная гипоксия (ПГ) является основным фактором, оказывающим негативное влияние на развитие центральной нервной системы у новорожденных. Целью данной работы явилось изучение влияния ПГ на физическое развитие и становление моторных рефлексов детенышей белых крыс, а также оценка влияния препарата семакс на последствия неонатальной гипоксии.

Работу проводили на крысах обоего пола. Было использовано 87 крыс из 8 выводков. Каждый выводок делили на 3 группы: животные 1-ой и 2-ой группы на 2 день жизни (дж) подвергались острой нормобарической гипоксии (ОНГ) (8% O₂ в течение 2 ч, T=37°C), в течение последующих двух недель (3-17 дж) животные 1-ой группы получали интраназальные инъекции воды, животные 2-ой группы получали и/н инъекции семакса. Крысы 3-ей группы (контроль) не подвергались гипоксии и с 3-17 дж получали и/н инъекции воды.

В наших экспериментах гипоксическое воздействие приводило к задержке соматического роста с 21 по 47 дни жизни у животных. Показателями физического развития потомства также является скорость созревания сенсорно-моторных рефлексов в период вскармливания. Нами было показано, что гипоксия привела к увеличению времени выполнения реакции в тестах «Рефлекс переворачивания на плоскости» (4 дж) и в тесте «Отрицательный геотаксис 45°» (11 дж). Оценка моторного развития в тесте «Отрицательный геотаксис 20°» (10 дж) показала увеличение времени выполнения реакции у крыс группы «Гип-К» и «Гип-Сем» по сравнению с контрольными животными,

однако, время выполнения реакции у животных группы «Гип-Сем» было достоверно ниже, чем в группе «Гип-К». У животных группы «Гип-К» отмечалось уменьшение времени удержания на вертикальном стержне (16 дж) по сравнению с группой «контроль». У животных группы «Гип-Сем» время выполнения реакции удержания достоверно не отличалось от контрольной группы.

На основании полученных результатов можно заключить, что 2-х часовая острая нормобарическая гипоксия на 2 день жизни крыс приводит к замедлению набора веса тела и нарушению становления моторных рефлексов, что свидетельствует о нарушении созревания ЦНС после используемого сеанса гипоксии. Последующее введение семакса ослабляет негативные последствия неонатальной гипоксии.

**Дигоксин – модификатор, избирательно повышающий противоопухолевую
активность препаратов платины**

**Чернов Василий Юрьевич, Калюжный Сергей Андреевич,
Мамичев Иван Андреевич**

*НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
labmedchem@mail.ru*

Гликолиз как основной источник энергии в аэробных условиях (эффект Варбурга) является безусловным отличием опухолевой клетки от нормальной. Ингибирование гликолиза при воздействии сердечных гликозидов, повышает цитотоксичность противоопухолевых препаратов *in vitro*; аналогичные данные *in vivo* отсутствуют. В настоящей работе исследовано влияние сердечного гликозида дигоксина на противоопухолевое действие цисплатина, эффективность которого ассоциирована с энергетически-зависимой репарацией повреждений ДНК, на модели асцитного рака Эрлиха.

Эксперименты проведены на мышах СВА/Лас с асцитным раком Эрлиха. Противоопухолевый эффект оценивали по продолжительности жизни животных с опухолью; при статистической обработке результатов использован критерий Фишера для множественных сравнений и тест Шапиро-Уилка.

Получены следующие результаты. 1) Методом проточной цитофлуориметрии и окрашивания ДНК флуоресцентным красителем Hoechst 33258 использованный штамм рака Эрлиха охарактеризован как поликлоновый с фракцией анеуплоидных клеток около 70%. 2) Определена нетоксичная доза модификатора: 1 мг/кг дигоксина при однократном внутрибрюшинном введении. 3) Определена область линейной зависимости доза-противоопухолевый эффект цисплатина: при однократном внутрибрюшинном введении цитостатика – 2,5 и 5 мг/кг. 4) Показано увеличение противоопухолевого действия цисплатина при введении дигоксина за 1 час до цитостатика: высоко достоверными ($p < 0,01$) оказались не только различия между группами «цисплатин 2,5 мг/кг» и «цисплатин 2,5 мг/кг+дигоксин», но и «цисплатин 2,5 мг/кг+дигоксин» и «цисплатин 5,0 мг/кг». Достигнуто увеличение продолжительности жизни животных с опухолью на 77% при дозе цисплатина 2,5 мг/кг, что в 2 раза выше эффекта монотерапии цитостатиком в этой дозе, и в 1,5 раза – при дозе цисплатина 5,0 мг/кг, которая является максимально эффективной, так как при дальнейшем повышении дозы противоопухолевого препарата отмечается гибель мышей от токсичности.

Таким образом, сердечный гликозид дигоксин является модификатором противоопухолевого действия цисплатина, приводя к более чем двукратному повышению его эффективности в пересчете на дозу цитостатика. Имея в виду дизайн настоящего исследования, считаем, что клиническая оценка эффективности дигоксина при терапии асцитных форм рака, диссеминированных по брюшине, является важной и реально выполнимой задачей.

Исследование поддержано грантами РФФИ (15-04-06991-а и 16-34-01049-мол-а) и Президента Российской Федерации (МК-7709.2016.7).

Влияние пренатальной гипоксии на содержание катехоламинов в надпочечниках и сыворотке крови крыс

Щербицкая Анастасия Дмитриевна

*Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,
Россия, Санкт-Петербург
nastusiq@gmail.com*

Внутриутробный период развития организма – это время, когда формируются системы, определяющие становление механизмов приспособления к условиям внеутробной жизни. Огромное влияние на процесс адаптации к постнатальной жизни оказывает симпато-адреналовая система, состояние которой отражают её медиаторы и гормоны. К основным патологическим факторам, способным нарушать механизмы саморегуляции и вызывать стойкие отдаленные последствия, относится пренатальная гипоксия. В связи с этим, значительный интерес представляет изучить влияние внутриутробной гипоксии на содержание катехоламинов у крыс в раннем онтогенезе, что стало целью данного исследования.

Состояние гипоксии плода было смоделировано путем трехчасового воздействия на беременных самок крыс линии Вистар (14-й день беременности) нормобарической гипоксии (в камере емкостью 100 литров, концентрация O_2 – 7%). У родившихся крысят забирали кровь на 5-й, 10-й, 20-й и 30-й день жизни для определения концентрации катехоламинов с помощью иммуноферментного анализа, а также были выделены надпочечники, в которых проводили анализ содержания норадреналина (НА) и адреналина (АД) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Показано, что пренатальная гипоксия приводит к достоверному снижению содержания НА и АД в надпочечниках крысят 5-го дня жизни, которое может быть результатом усиленной секреции катехоламинов в кровь, что также обнаружено в нашем исследовании при анализе сыворотки. Начиная с 10-го дня жизни у животных, перенесших пренатальную гипоксию отмечается нормализация уровня НА в надпочечниках и крови, однако у этих животных в возрасте 10, 20 и 30-ти дней жизни выявлено снижение АД в надпочечниках при достоверно не изменяющихся показателях в крови. Возможно, это связано с повышенной активностью в надпочечниках ферментов, осуществляющих метаболическую инактивацию катехоламинов.

Таким образом, пренатальная гипоксия оказывает существенное негативное влияние на развивающийся организм в период эмбриогенеза, вызывая изменения содержания и нарушения метаболизма катехоламинов в надпочечниках и плазме крови крысят различного возраста. Однако механизмы этих изменений требуют дальнейшего изучения.

Возраст первого цветения травянистых альпийских малолетников северо-западного Кавказа

Казанцева Е.С.¹, Кипкеев А. М.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

²Карачаево-Черкесский государственный университет имени У.Д. Алиева,
Россия, Карачаевск
biolenok@mail.ru

Возраст первого цветения (ВПЦ) у травянистых растений имеет большое биологическое значение как показатель скорости онтогенеза и может различаться у растений разных эколого-ценотических стратегий. Изучение ВПЦ девяти альпийских малолетников проводили в Карачаево-Черкесской республике на горе Малая Хатипара на высоте 2800 м над уровнем моря. В 2009 году были заложены постоянные площадки, число и размер которых варьировали в зависимости от плотности популяций видов. Наблюдения за маркированными особями проводили с 2009 по 2014 гг.

По результатам шестилетнего мониторинга мы установили, что ранее всех, на второй год, зацветают *Anthyllis vulneraria*, *Murbeckiella huetii* и *Trifolium badium*. На третий – *Carum meifolium*, *Draba hispida* и *Sedum tenellum*. Не ранее четвертого – *Eritrichium caucasicum*. Позднее всех, на шестой год жизни, зацветает *Androsace albana*. ВПЦ для *Minuartia recurva* установить не удалось. Помимо этого, было отмечено, что одновозрастные особи исследуемых видов зацветали несинхронно, что является проявлением поливариантности. ВПЦ для особей *A. vulneraria* может наступать на 2, 3 и 4 годы жизни, *C. meifolium* на 3, 4, 5 и 6, *D. hispida* на 3, 4 и 5, *E. caucasicum* на 4, 5 и 6, *M. huetii* на 2 и 3, *S. tenellum* на 3, 4 и 5, *T. badium* на 2, 3, 4 и 5. В результате высокой смертности всходов и ювенильных растений не многие особи доживали до перехода в генеративную стадию. Например, из 146 проростков *A. albana* до шестого года жизни дожило 9 растений, из которых только одно растение зацвело. Из 330 проростков *C. meifolium* до пятого года жизни дожило 21 растение, из которых две особи зацвели.

Мы установили, что малолетние виды в условиях альпийских высокогорий Северо-Западного Кавказа зацветают не ранее второго года жизни, обладают значительной поливариантностью онтогенеза, которая проявляется в варьирование ВПЦ. Также было отмечено, что довольно большая часть особей погибает, не достигнув генеративной стадии. Короткий прегенеративный период *A. vulneraria*, *D. hispida*, *C. meifolium*, *M. huetii*, *S. tenellum* подтверждает их принадлежность к видам рудеральной стратегии.

Особенности видового состава и динамики травяно-кустарничкового яруса в ельнике после гибели древостоя в очаге размножения короеда-типографа

Каплевский А. А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

Dron_of_geobot@list.ru

Направления изменения лесной растительности в очагах усыхания ели после всплеск численности короеда типографа (*Ips typographus*) в 1999-2012 годах в Московской области мало изучены. Применяемые сейчас сплошные санитарные рубки, приводят к образованию луговых сообществ на месте ельников.

Цель исследования – выявление особенностей изменения травяно-кустарничкового яруса и мохового покрова после гибели древостоя в сравнении с фитоценозами после вырубки сухостоя и исходным лесом.

В ходе работы, на территории Звенигородской биологической станции МГУ заложены постоянные пробные площади в трёх фитоценозах, возникших в ельнике зеленчуковом: с погибшим в 2012 году древостоем ели, после сплошной вырубки ели и в ельнике с живым древостоем. На каждой пробной площади сделано полное геоботаническое описание и заложены по три трансекты длиной 40 м. Вдоль линий этих трансект в 2013 и 2014 годах проведено изучение изменений травяно-кустарничкового яруса (ТКЯ) и мохового покрова.

Сравнение видового состава ельника с погибшим и сохранившимся еловым древостоем ели показало, что при гибели ели число видов увеличилось незначительно, число ценотических групп видов не изменилось. На вырубке произошло резкое изменение видового состава. Число ценотических групп выросло в полтора раза, появились луговые и сорно-луговые виды.

Видовое богатство мхов на вырубке в полтора раза больше, чем в ельнике с погибшим или сохранившимся древостоем. Встречаемость всех видов мохового покрова, кроме *Cirriphyllum piliferum* (Hedw.) Grout после гибели древостоя ели увеличилась.

Ординация (ДСА) площадок по встречаемости видов ТКЯ и мохового покрова выявила тренд уменьшения отличий растительности ельника с погибшим древостоем и увеличения отличия вырубки от исходного ельника.

Сохранение сухостоя и естественный ход лесовосстановления ведет к сохранению ТКЯ, характерного для лесного фитоценоза, изменяется только соотношение видов. Серьезное изменение ТКЯ на вырубке связано с появлением открытого фитоценоза без деревьев, нарушением подлеска, ТКЯ, мохового покрова и почвы.

Распространение инвазионных растений в поймах рек

Корстелева Т. П., Романенкова А. А.

*ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет имени И.Г. Петровского»,
естественно-географический факультет, Россия, Брянск
tatyana.crex1995@yandex.ru*

Мониторинг процессов внедрения инвазионных растений в природные экосистемы – актуальная задача современной биологии. Речные долины являются естественными коридорами, по которым отдельные виды и растительные сообщества проникают за пределы ареала.

Материал собран во время флористических и геоботанических исследований, выполненных в 2013-2015 гг. в долинах рек Брянской области.

В поймах рек зарегистрировано 24 вида чужеземных растений, внедрившихся в естественные местообитания.

Acorus calamus: мелководья вдоль русла, западины в пойме, изредка.

Aser negundo: прирусловые валы, пойменные дубравы и ивняки, обычно.

Aster × *salignus*: луга, редко.

Bidens frondosa: берега рек, отмели, поймы, завалы в русле рек, часто по нарушенным местам, часто.

Conyza canadensis: береговые обрывы, отмели, прирусловые валы, сбитые луга,

песчаные гривы, вдоль дорог, часто.

Echinocystis lobata: приустьевые валы, приустьевые ивняки; обычно.

Elodea canadensis: мелководья стариц, мелиоративные каналы, изредка.

Epilobium adenocaulon, *E. pseudorubescens*: отмели, изредка.

Eragrostis albensis: песчаные отмели, изредка.

Erigeron annuus: береговые обрывы, отмели, приустьевые валы, сбитые луга, луга центральной поймы, песчаные гривы, вдоль дорог, часто.

Festuca arundinacea: вдоль дорог, редко.

Heracleum sosnowskyi: сообщества пойменных лугов и ивняков, редко.

Impatiens grandulifera: нарушенные местообитания в населенных пунктах, редко.

Impatiens parviflora: вдоль тропинок и дорог в пойме, пойменные леса, береговые обрывы, редко.

Juncus tenuis: отмели, пастбища, вдоль грунтовых дорог в пойме, обычно.

Lupinus polyphyllus: луга, вдоль дорог, редко.

Oenothera biennis, *O. rubricaulis*: береговые обрывы, приустьевые валы, гривы, вдоль дорог; обычно.

Salix fragilis: приустьевые валы, у дорог, нечасто.

Solidago canadensis, *S. gigantea*: очень редко на лугах.

Xanthium albinum: песчаные отмели, береговые обрывы, сбитые луга, обычно.

Zizania latifolia: по берегам, редко.

Большая часть инвазионных растений является неактивными и низкоактивными видами. Среднеактивные: *Echinocystis lobata*, *Bidens frondosa*, *Conyza canadensis*, *Oenothera biennis*, *Erigeron annuus*. Низкоактивные, но наиболее опасные: *Heracleum sosnowskyi* и *Solidago canadensis*.

**Изучение второго послеаварийного поколения сосны обыкновенной из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС по морфометрическим показателям хвои
Макаренко Е.С.¹, Телюева А.В.¹, Терехов В.С.²**

¹Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии,
Россия, Обнинск

²Обнинский институт атомной энергетики НИЯУ «МИФИ», Россия, Обнинск
makarenko_ek_obninsk@mail.ru

Отдаленные последствия действия радиации на живые организмы в природных условиях являются одним из основных вопросов в радиобиологии. Целью данной работы являлась оценка морфометрических показателей хвои у второго поколения сосны обыкновенной из 30-км зоны Чернобыльской АЭС.

Исследуемые саженцы выращивали в питомнике (до пересадки в 2010 г.) на радиоактивно незагрязненной территории, дозовые нагрузки для родительских популяций на 01.06.1986 г составляли 4-5, 10-20 и 80-100 Гр. Для анализа длины, массы, индекса флуктуирующей асимметрии отбирали однолетнюю хвою 2011, 2012, 2013, 2014 гг. (по 10, 15, 20, 20 пар хвоинок с каждого дерева соответственно). В контроле проанализировано 28-32 деревьев, второе послеаварийное поколение представлено 30-33 растениями.

Результаты данного исследования показали, что в 2011 г. в группе потомков из зоны летального поражения (80-100 Гр) длина и масса хвои были значимо снижены

($p \leq 0,05$ и $p \leq 0,001$, соответственно); вероятно этот эффект связан с пониженной способностью этих растений преодолевать последствия пересадки. Длина и масса хвои 2012, 2013 и 2014 гг. во всех дозовых группах сохраняются значимо выше ($p \leq 0,001$) относительно контрольной группы. Наиболее вероятно, что величина хвои 2012 г. связана с включением компенсаторных механизмов, направленных на преодоление последствий пересадки. Данные по хвое 2013 и 2014 гг. скорее говорят о проявлении одного из типичных радиоморфозов – гигантизма хвои. В 1987 г. интенсивный рост хвои сосны обыкновенной был отмечен у растений, подвергшихся воздействию доз от 3-4 до 8-10 Гр.

По результатам определения индекса флуктуирующей асимметрии по длине и массе хвои нарушений стабильности развития не обнаружено.

Известно, что при облучении растений в зависимости от дозы возможно как усиление метаболизма, сопровождающееся явлениями стимуляции, так и угнетение. В настоящем исследовании выявлено влияние острого облучения родительских деревьев на ростовые процессы во втором послеаварийном поколении.

Таким образом, результаты данной работы показали, что потомки сосны обыкновенной второго пострадиационного поколения характеризуются гигантизмом хвои и меньшей устойчивостью к стрессу.

Морфологические особенности сеянцев *Prunus armeniaca* L. различного эколого-географического происхождения в условиях Горного Дагестана

Османов Р. М.

Горный ботанический сад ДНЦ РАН, Россия, Махачкала

osmanov.1990@list.ru

Морфологические особенности сеянцев *Prunus armeniaca* L. на начальных стадиях их развития, можно рассматривать в рамках генетического, популяционного, экологического и географического аспектов формирования побеговой структуры сеянцев *P. armeniaca*, а с практической стороны для целей экологической селекции. Кроме этого возможна прогнозная оценка связей между морфологическими признаками ювенильных растений с их признаками устойчивости и продуктивности.

Целью нашей работы являлось сравнительное изучение морфологических особенностей сеянцев *P. armeniaca* различного эколого-географического происхождения в условиях Горного Дагестана.

Морфологические особенности у однолетних сеянцев *P. armeniaca* изучались на конец завершения ростовой активности (конец сентября) на экспериментальном участке Горного ботанического сада ДНЦ РАН (Гунибская экспериментальная база 1700 м н. ур. м.). В качестве объектов для исследования в данной работе были использованы сеянцы *P. armeniaca* различного эколого-географического происхождения (32 образца) из 4х групп («таджикские», «дагестанские дикорастущие», «даг. культурные» и «московские»).

При анализе ростовой активности сеянцев *P. armeniaca* выявились следующие закономерности. В целом, наибольшими средними значениями по всем признакам выделилась группа «таджикские». В отличие от нее средние значения признаков группы «дагестанские культурные» были наименьшие. Остальные группы характеризовались промежуточными показателями «даг. дикорастущие» по высоте побега и облиственности ближе относятся к «даг. культурным», а по разветвленности к «таджикским».

Морфологические признаки однолетних сеянцев *P. armeniaca* могут дать достаточно точную прогнозную оценку в разграничении эколого-географических групп. Установлено, что сеянцы «таджикской» группы *P. armeniaca* выделились наибольшими средними значениями по морфологическим признакам, а наименьшими характеризовались «дагестанские культурные», и эти различия статистически достоверны по t-критерию Стьюдента.

На основе сопоставления разных эколого-географических групп *P. armeniaca* по морфологическим признакам сеянцев и литературных данных сделано заключение, что культурные сорта и дикорастущие формы абрикоса Дагестана имеют больше сходство с ирано-кавказской эколого-географической группой.

На основе данных исследований написаны следующие проекты: «Молодежный исследовательский клуб практической биоэкологии «ЭкоМикс»», поддержанный на форуме Машук-2013; «Молодежный научно-образовательный сад «Apricot stone»», поддержанный фондом Гаджи Махачева (2015 г.) Последний проект является актуальным в связи с тем, что 2015 год являлся «Годом Садоводства» в Республике Дагестан.

Современное состояние лесной растительности памятника природы регионального значения Сахалинской области «Вулкан Менделеева»

Смолякова У. А.

*Сахалинский Государственный Университет, Россия, Южно-Сахалинск
ulyana23-93@mail.ru*

Видовой состав растений памятника природы является важнейшей интегральной характеристикой растительных сообществ. По видовому составу можно судить об экологических условиях окружающей среды и динамике сообществ.

Остров Кунашир, где расположен памятник природы регионального значения Сахалинской области «Вулкан Менделеева», является самым богатым по флористическому разнообразию во всей Большой и Малой Курильской гряде. В 2013 году министерством лесного и охотничьего хозяйства Правительства Сахалинской области начата большая работа по инвентаризации особо охраняемых природных территорий Сахалинской области.

Сбор и обработка фактического материала по оценке современного состояния растительности проводились по общепринятым методикам. В частности, фитоценотическая оценка различных растительных формаций памятника.

На рассматриваемой территории, с различной степенью выраженности выделили следующие основные растительные формации и группировки: темнохвойные леса, хвойно-широколиственные леса, каменно-берёзовая формация, долинные (пойменные) леса, заросли кедрового стланика, высокогорная растительность, бамбучники.

Анализ видового состава лесной растительности памятника природы, позволил выделить доминирующие виды древесных растений: ель аянская (*Picea ajanensis*), пихта сахалинская (*Abies sachalinensis*) и ель Глена (*Picea glehnii*) на долю которых приходится до 60 % лесов. Что касается хвойно-широколиственных фитоценозов, то на территории памятника природы они распространены не столь широко, как темнохвойные. Каменноберезняки на наиболее высоких горных образованиях памятника природы «Вулкан Менделеева» представляют собой самостоятельный растительный пояс.

Долинные леса, в связи со слабой разработанностью пойм рек и речек, распространены не так широко, как предыдущая формация и, следовательно, занимают небольшие площади.

Формации кедрового стланика занимают 15% территории памятника природы, из этого следует, что они занимают устойчивые ценоотические позиции и покрывают почти все горные вершины.

Заросли бамбучков на территории памятника природы «Вулкан Менделеева», как и на всем острове Кунашир, распространены очень широко.

Памятника природы «Вулкан Менделеева» - уникальный, невосполнимый, ценный в экологическом, научном, культурном и эстетическом отношении природный комплекс. Его естественнонаучная ценность заключается в возможности мониторинга состояния окружающей природной среды, изучении природных экосистем и их компонентов.

Сравнение видового состава антофильных насекомых с *Heracleum sosnowskyi* и *Seseli libanotis*

Савина К. А., Устинова Е. Н.

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва

Ustinolena@ya.ru

Борщевик Сосновского *Heracleum sosnowskyi* Manden - агрессивный инвазионный вид растений семейства Ариáceае, исследование особенностей биологии и экологии которого представляет большой практический интерес. Взаимодействия занесенных видов растений с коренными насекомыми позволяет предсказывать и контролировать распространение этих растений. Так как представители Ариáceае – неспециализированные энтомофилы, для выявления привлекательности интродуцента необходимо сравнение посещающих его соцветия насекомых с другими зонтичными. В ходе нашей работы мы изучали состав насекомых, посещающих соцветия борщевика Сосновского и растущего в тех же биотопах другого зонтичного растения – жабрицы порезниковой (*Seseli libanotis* (L.) Koch).

Сбор насекомых проводили в конце периодов цветения *H. sosnowskyi* и *S. libanotis* 20-24 июля 2015 года в пойме Москва-реки близ территории Звенигородской биологической станции им. Скадовского Одинцовского р-на Московской обл.

На соцветиях *H. sosnowskyi* выявили не менее 47 видов насекомых (возможно, их больше, так как некоторые особи были определены не до вида) из 5 отрядов: Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Hymenoptera, Lepidoptera. На соцветиях *S. libanotis* обнаружили не менее 29 видов, принадлежащих к тем же 5 отрядам. Из них 15 видов были обнаружены и на *S. libanotis*, и на *H. sosnowskyi*. При этом отряд Coleoptera насчитывает 5 общих видов, отряд Diptera – 5, отряд Hymenoptera – 4, отряд Lepidoptera – 1. Индексы фаунистического сходства для списков видов насекомых, посещающих эти два вида зонтичных, составили: Жаккара – 0.25, Сёренсена – 0.39.

Таким образом, несмотря на часто свойственную инвазионным видам недостаточную связь с местными насекомыми, *H. sosnowskyi* привлекает большее количество видов насекомых, чем *S. libanotis*, в том числе опылителей, благодаря чему успешно распространяется на новых территориях. Кроме того, индексы Жаккара и Сёренсена наглядно демонстрируют нам, что виды, посещающие соцветия жабрицы порезниковой и борщевика Сосновского довольно сильно различаются.

Мы выражаем благодарность нашему руководителю С.Н. Лысенкову (кафедра биологической эволюции МГУ).

Сукцессии фитоценозов пойменных лугов при снижении воздействия антропогенного фактора

Шаманин А. А.

Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, Архангельск
lexxik_1@mail.ru

Хозяйственная деятельность человека оказывает сильнейшее воздействие на ботанический состав луговой растительности, ее продуктивность и динамику изменений при внесении удобрений, бороновании, фрезеровании дернины, подсева многолетних трав на пойменных лугах. Только при доминировании хозяйственно-ценных кормовых трав семейства Мятликовых *Poaceae* и Бобовых *Fabaceae* в фитоценозах возможно получение высокой урожайности и качества кормов.

Геоботанические обследования контрольных участков проводились на пойменных лугах дельты Северной Двины в течение 10 лет.

В результате исследований установлено, что при активном сенокосном использовании луга и при проведении мероприятий по уходу за ним, но при позднем (вторая декада июля) укосе травостоя, в растительном сообществе преобладали раннеспелые виды. Растительное сообщество было представлено в основном злаковыми травами – 70%, с присутствием бобовых и разнотравья – 18% и 12% соответственно. Доминанты сообщества: *Alopecurus pratensis* L. – 40%, *Dactylis glomerata* L. – 18%, *Vicia cracca* L. – 16%, *Ranunculus acer* L. – 10%. Отсутствие мероприятий по уходу на фоне несвоевременного скашивания привели к деградации травостоя. Доля участия рыхлокустовых злаков сократилась с 25% до 10%, выпала из травостоя *Festuca pratensis* L., доля корневищных злаков увеличилась у *Bromopsis inermis* L. с 2 % до 8%, у *Digraphis arundinaceae* L. с 2% до 12%. Отмечалось и увеличение обилия разнотравья, особенно крупного разнотравья *Veratrum lobellianum* L., *Angelica sylvestris* L., *Filipendula ulmaria* L.. При полном прекращении хозяйственной деятельности на сенокосном участке наблюдалось накопление растительных остатков. На смену ценным в кормовом отношении злакам *Festuca pratensis* L., *Alopecurus pratensis* L., *Dactylis glomerata* L. пришли менее ценные – плохо поедаемые *Deschampsia caespitosa* L., осоки и т.д. Из фитоценоза ушли представители семейства *Fabaceae* L., наиболее активно развивалось разнотравье семейства *Asteraceae* L. и *Apiaceae* L..

На основании десятилетнего периода исследований установлено, что идет процесс изменения видового состава и структуры фитоценоза. Фитоценоз культурного кормового угодья постепенно преобразовался в растительное сообщество природного луга.

За помощь в научной деятельности выражаю благодарность научному руководителю Любовей Светлане Викторовне.