

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ГЕНЕТИКА – ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОСНОВА ИННОВАЦИЙ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЕКЦИИ

*Материалы VIII научно-практической конференции
с международным участием*

Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г.

Ростов-на-Дону – Таганрог
Издательство Южного федерального университета
2019

УДК 575.1/.2:599.89

ББК 28.04

Г34

Конференция поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 19-04-20110)

Главный редактор:

доктор биологических наук, профессор *Т.П. Шкурат*

Редакционная коллегия:

доктор биологических наук, профессор *А.В.*

Усатов;

доктор технических наук, профессор *А.Е.*

Панич;

доктор биологических наук

В.А. Чистяков;

доктор биологических наук, профессор *А.М.*

Менджерщкий;

доктор биологических наук, профессор *Е.В.*

Машкина;

доктор биологических наук

М.А. Сазыкина

Г43 **Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции:**

Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г.) ; Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону ; Таганрог : Издательство Южного федерального университета, 2019. – 254 с.

ISBN 978-5-9275-3236-0

Конференция широко известна и очень популярна, как в российских научных кругах (Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск, Ростов-на-Дону, Краснодар, Майкоп, Махачкала, Владикавказ, Ставрополь, Крым, Томск, Красноярск, Иркутск, Якутск, Челябинск), так и среди учёных Ближнего и Дальнего зарубежья (Беларусь, Армения, Казахстан, Германия, США). В конференции традиционно принимают участие более 400 научных сотрудников и студентов, специалистов в области генетики, селекции и биотехнологии.

В настоящем сборнике представлены результаты исследований по организации геномов про- и эукариот, клинической генетике и персонализированной медицине, биоинформатике, генетике животных и растений, селекции, клеточным и геномным технологиям, биотехнологии, генетике бактерий и генотоксикологии.

УДК 575.1/.2:599.89

ББК 28.04

ISBN 978-5-9275-3236-0

© Южный федеральный университет, 2019

**TRANSCRIPTOME-BASED BIOLOGICS REPOSITIONING USING
MACHINE LEARNING APPROACHES**

*Arsen Arakelyan¹, Lilit Nersisyan², Maria Nikoghosyan^{1,2}, Siras Hakobyan²,
Henry Loffler-Wirth³, Hans Binder³*

¹Russian-Armenian University, Institute of Biomedicine and Pharmacy, 0051, Armenia, Yerevan, Ovsep Emin Street, 123

²Research Group of Bioinformatics, Institute of Molecular Biology NAS RA, 0014, Armenia, Yerevan, Asratyan Street, 7

³Interdisciplinary Centre for Bioinformatics, University of Leipzig, D-04107, Germany, Leipzig
E-mail: aarakelyan@sci.am

Drug repositioning (repurposing) is the identification of alternative target diseases for already approved drugs. This process can save considerable time and resources and significantly speed up the drug development process. Transcriptome based drug repositioning approaches employ analysis of gene expression and identification of molecular targets that show anti-correlated differential expression in disease and upon drug administration. The main limitation of these methods is that only overlapping sets of genes or processes that describe the main drug target mechanism are scored for assessment of repositioning “potential” for a drug, while the off-target and alternative processes or pathways involved in disease pathogenesis are neglected. Meanwhile, the latter may overtake drug-actions or cause adverse effects that are important to consider. We have developed a transcriptome based multi-layer self-organizing maps approach for drug repositioning and adverse effect evaluation. It allows for a holistic view on full transcriptome landscapes and for disentangling functional modules of dysregulated genes in diseased states and upon drug action. We have used our pipeline to identify new targets for infliximab (anti-tumor necrosis factor antibodies, approved for ulcerative colitis and Crohn’s disease) and brodalumab (anti-interleukin-17 antibodies, approved for psoriasis). Our results indicate that infliximab can be considered as off-label indication for pulmonary sarcoidosis. At the same time, we observed the failure of brodalumab to affect dysregulated functional gene clusters in Crohn’s disease and systemic juvenile idiopathic arthritis, clearly indicating that this drug is contraindicated in these diseases.

**HEALTH TRAJECTORIES OF HETEROZYGOUS CARRIERS
AS A NOVEL RESOURCE FOR THE STUDY OF HUMAN BODY
HOMEOSTASIS**

Ancha Baranova

George Mason University, Virginia, USA

E-mail: abranov@gmu.edu

An advent of Next Generation sequencing enabled scanning individual human genomes and mass extraction of naturally occurring gene-modulating mutations contributing to detectable phenotypes that affect human health. Importantly, this approach allows one to dissect even slight metabolic changes resulting from carriership rather than a homozygosity for common deleterious variants. While exerting no, or almost no influence on the phenotypes of young individuals, these variants do contribute to

health trajectories throughout the process of ageing. We call for community-wide efforts in building the database for genotype-phenotype correlations in human variome, with an emphasis on incomplete penetrance, haploinsufficiency, and heterozygote advantage in humans. These efforts could not be made without active, longitudinal involvement of the parents of children with autosome-recessive disorders, a stakeholder cohort enriched in heterozygous variants and keenly interested in advancing understanding of human genetics.

ОТ СИГАЛЬНЫХ ГЕНОВ ДО ГЕНОМНОЙ СЕЛЕКЦИИ

М.М. Асланян

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Российская Федерация,
г. Москва, Ленинские горы, 1
E-mail: marlen32@mail.ru*

Одним из основоположников генетики и селекции животных в нашей стране являлся выдающийся биолог – академик Александр Сергеевич Серебровский. Работая на Аниковской генетической станции (1921–1928 гг.), Серебровский предложил для генетического анализа количественных признаков использование «сигналы – сигнальные гены» – прообраз современных генетических маркеров. Метод «сигналей» не был реализован в первой половине XX века ввиду отсутствия методов картирования генов на хромосомах хозяйственно-полезных видов культурных растений и сельскохозяйственных животных. В последние десятилетия произошёл существенный прогресс в создании генетических карт сельскохозяйственных животных с использованием традиционного гибридологического анализа, гибридизации соматических клеток, методами современной цитогенетики, позиционного и функционального анализа генома.

Успех геномной селекции опирается на многие генетико-селекционные приёмы, такие как: оценка производителей по родословной и по качеству потомства; комплексная оценка по индексам телосложения, продуктивности и жизнеспособности; ранняя оценка потенциальной продуктивности (живая масса, удой, жирность молока, настриг шерсти), а также использование методов математико-статистического анализа (коэффициенты корреляции, регрессии, наследуемости, повторяемости и др.) и биоинформатических подходов. Основным интересом при использовании молекулярного подхода в селекции полигенных признаков являются локусы, обозначенные термином QTL (quantitative trait loci) – дискретные, относительно устойчивые локусы, которые независимо от условий, в той или иной степени, сказываются на величине количественных признаков.

В XXI в. генетики и селекционеры используют неограниченное число разнообразных молекулярно-генетических маркеров: белковой природы (группы крови, изоферменты, трансферины и др.) и различные полиморфизмы ДНК. Идея А.С. Серебровского о «сигналах» превзошла все ожидания генетиков и селекционеров, и теперь в их распоряжении имеются миллионы молекулярно-генетических маркеров, которые используются в маркер-ассоциированной селекции (МАС) и геномной селекции.

Благодаря разработке технологии определения последовательности нуклеотидов ДНК всего генома стало возможным выявление её корреляции с показателями продуктивности и племенными качествами молочного скота, свиней. Для геномной оценки племенной ценности животных проводится исследование взятого от них биологического материала (крови, спермы, волос, выщипов) путём выделения ДНК, генотипирования на чипах и последующего статистического анализа полученных данных. Геномная селекция – это тестирование генома сразу по большому количеству маркеров, покрывающих весь геном, так что локусы количественных признаков (QTL) находятся в неравновесном сцеплении хотя бы с одним маркером. В геномной селекции

сканирование генома происходит с использованием чипов (матриц) с 50–60 тысячами SNP (которые маркируют основные гены количественных признаков) для выявления однонуклеотидных полиморфизмов вдоль генома животного, определения генотипов с желательным проявлением совокупности продуктивных признаков и оценки племенной ценности животного.

Геномная селекция молочного скота предполагает отбор животных путём прогнозирования племенной ценности быков-производителей с использованием единичных полиморфизмов (SNP), коррелирующих с хозяйственно полезными признаками. Определение геномных профилей проводится с помощью специально разработанных панелей, отображающих перечень распределённых по геному полиморфизмов. Практическое применение технологий геномной селекции начинается с создания референтной базы быков, оцененных по качеству потомства. Как минимум, она должна состоять из 5–6 тысяч животных. От того, насколько точно и качественно сформирована эта группа, зависят результаты всей последующей работы. Чтобы получить максимальный эффект, зарубежные селекционеры объединяют усилия. Для каждой породы создаются свои референтные базы производителей, оцененных по качеству потомства. Главными преимуществами геномной селекции перед традиционной являются возможность оценки животных уже при рождении, а также возможность проводить их отбор по признакам, измерение которых проблематично.

За геномной селекцией будущее животноводства. На Западе это поняли сразу же после расшифровки генома животных. В 2004 г. секвенирован геном коровы и около десяти лет назад уже начаты работы по геномной оценке быков. В 2009 г. был расшифрован геном свиньи. Разработан SNP-чип (вариант ДНК-микрочипа), содержащий 60 000 генетических маркеров генома. Образец ДНК свиньи можно тестировать на наличие или отсутствие практически всех важных точечных мутаций, определяющих продуктивные признаки. Таким образом, отбор лучших животных может быть основан на генетических маркерах без измерения фенотипических показателей.

В Российской Федерации осуществляется ряд проектов реализации развития племенного и товарного животноводства на основе методов генного и геномного анализа. Если в отношении геномной селекции племенного молочного скота мы только в начале пути, то в свиноводстве имеются выдающиеся результаты совершенствования и ускорения селекционного процесса, в основе которого лежат современные генетические и геномные технологии. Знаменский селекционно-генетический центр, созданный в 2006 г. в Орловской области агрохолдингом «Эксима», является одним из крупнейших в России производителей и поставщиков племенного материала для свиноводства. Ежегодно на предприятиях СГЦ производится свыше 80 тыс. голов ремонтного молодняка. Компания занимается производством чистопородных животных материнских линий Крупная белая и Ландрас для племенных репродукторов; чистопородных хряков и семени отцовских линий Магнус (Дюрок) и Макстер (Пьетрен) для товарных репродукторов; гибридных родительских свинок F-1 (Либра), полученных от комбинации пород Крупная белая и Ландрас для комплектации товарных репродукторов (более 65 тыс. в год). Племенная работа организована на основе совместной программы разведения с компанией Нурог и строится на индексах BLUP (лучший линейный несмещённый прогноз) для материнских и отцовских линий. С 2012 г. началось применение широкомасштабной геномной селекции.

В производственную структуру «Знаменского СГЦ» входят: три племенных завода для материнских линий пород Крупная белая и Ландрас; племенной завод для отцовских линий пород Магнус (Дюрок) и Макстер (Пьетрен).

РОДОСЛОВНАЯ КНИГИ КЛЕТКИ

П.И. Белобров

*Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета,
660041, Российская Федерация, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
E-mail: peter.belobrov@gmail.com*

Основная проблематика биологии состоит в передаче наследственной информации от поколения к поколению и реализации этой информации в каждом поколении [1]. Барбара МакКлинтон

завершила свою Нобелевскую речь мыслью о геноме как органе клетки [2]. Недавно доказано, что геном не является изолированным островком в клетке [3]. В концепции расширенного наследования рассмотрены эпигенетические, поведенческие и культурные факторы [4], вирусный симбиоз и холобионтная природа генома человека [5], понимание жизни как «социального» процесса, основанного на взаимодействии сетей РНК, в которых вирусы и клетки постоянно взаимодействуют [6], и вместе с этим предложена целостная интеграция различных систем наследования [7]. Существование органических кодов (от генетического кода и до кодов культуры) является экспериментальным фактом, имеющим важные теоретические следствия: 1) основные события макроэволюции были связаны с возникновением новых органических кодов, дающих правильную реконструкцию истории жизни; 2) коды содержат значения, поэтому необходимо их введение в биологию вместе с информацией понятия биологического значения; 3) главное теоретическое значение вытекает из факта сохранения в эволюции органических кодов, которые являются инвариантами жизни. Изучение органических кодов клеточной родословной позволит понять механизмы негенетического наследования при развитии геномов, клеток и тканей, вместе с новыми фундаментальными законами биологии [8]. Главной сущностью наследования в живых системах является появление нового (эмерджентности) при каждом делении любой клетки [9].

Первые принципы биологии и родословная каждой клетки [10, 11], созданная всеми внутриклеточными структурами, образующими целостную индивидуальную биологическую книгу, написанную внутриклеточным химическим и межклеточным биологическим языками, позволяют создавать точное решение проблемы наследования. Все стороны живой Природы с необходимостью надо рассматривать на многих уровнях организации, используя математические, физические, химические, биологические, лингвистические и другие нечисловые переменные, причём надо постоянно заботиться о том, чтобы избежать нечёткого смешения нечисловых величин и мер разных наук. Достаточным условием гармонии будет самосогласование химических и биологических кодов всех уровней в развитии.

Рассмотрим абстрактное биологическое клеточное пространство. Элементами или точками этого пространства разумно считать клетки. Каждое клеточное деление можно рассматривать как увеличение размерности пространства. Преобразование клетки в органический материал является уменьшением размерности этого пространства. Можно, конечно, выделить типы клеток для уменьшения размерности клеточного пространства, хотя этот шаг делает громоздким построение, так как нам надо изложить на конечном количестве страниц всю структуру решения задачи биологического наследования с помощью родословной книги клетки. В докладе на примерах математических клеточных пространств будет рассмотрен вопрос их гомотопической эквивалентности с биологическим и химическим пространствами.

С нашей точки зрения, все соединения органической химии, которые располагаются внутри живой клетки, образуют химические тексты. Биологический и химический смысл этих текстов измеряется («читается») опять-таки химическими структурами такого же или чуть более сложного строения (надмолекулярными комплексами и супрамолекулярными соединениями). Семантический анализ химической лингвистики обязан существованию органических кодов биологии [9].

Реальное химическое действие $\sim 10^{10} - 10^{12}$ различных олигомеров, полимеров и комплексов в одной клетке требует дополнительного глубокого анализа, при котором будут открыты иерархии химических кодов и различных химических языков со своими грамматиками. Говоря на более общем языке нечисловых собственных химических переменных клетки, можно заметить, что формирование биологических языков взаимного действия клеток друг на друга начинает происходить внутри каждой клетки. Таким образом, каждая клетка содержит в себе собственное химическое и физическое пространства, которые существенно отличаются друг от друга.

Реальное биологическое действие происходит в $\sim 10^{12} - 10^{14}$ различных клеток живого организма, из которых половина – бактериальные клетки микробиома каждого организма. Формирование функциональных пространств, отображающих множества клеток и тканей на органы целостного организма, может быть сделано в представлении родословной книги клетки. Конечно, в настоящее время в этом направлении требуется более глубокое развитие теории нечисловых

переменных и новых биологических мер, позволяющих рассматривать проектирование, вложения, расслоения, разрезы, склейки и гомологии разных по своей природе пространств. Важно, что при этом основные биологические представления, которые уже разработаны к настоящему времени в фундаментальной биологии без попыток традиционной редукции к математическим и физическим мерам, будут сохраняться в рамках биологических законов развития живых систем и позволять создавать новые конструктивные вопросы для экспериментальной проверки.

Представьте себе процесс, который идёт монотонно, непрерывно в пространстве гигантской размерности. Все различные частицы в сопровождении собственной волны совершают беспокойные действия, пытаясь создать новое в рамках своего паттерна. При этом все их соседи делают нечто похожее. Этот танец под музыку жизни не перенести в двумерие и не воспроизвести в слабом многомерии, он лишь сохраняется в динамической родословной клеточной книги, которая (да! не удивляйтесь) сама и является клеткой. Не понимаете? Клетка, пока живая, тоже этого не понимает. Она лишь играет свою музыку, прислушиваясь, присматриваясь и принимаясь к соседним клеткам, составляя вместе ткань, орган и организм, время от времени встряхивая собственное содержимое, не давая ему залежаться в закоулках гигантской библиотеки. Клетке очень не хочется быть разобранной на органику. А тут ещё организму понадобилось новую мысль создать, соседки-клетки подсказывают, но что-то не получается, придётся поделиться, дочки поживее будут, сообразят быстро. Это краткое романтическое описание родословной книги клетки предлагаю сопроводить изучением интегрированной митотической стволовой клетки на модели, созданной в Институте клеточных наук Аллена [12], которая по сути является клеточной мерой Аллена.

Изучая модель [12] на своём компьютере, вы вместе с разработчиками откроете для себя раннюю прометафазу клеточного цикла, сравните по своему усмотрению расположение основных органов клетки, и, самое главное, клеточная мера Аллена поможет вам понять высокую размерность внутреннего пространства клетки и хорошо представить себе биологическое пространство всех клеток конкретного организма. После этого предположение о том, что родословная клетки является главным элементом биологического наследования будет достаточно естественным.

В докладе родословная клеточной книги будет изложена с помощью биологических величин, переменных и мер на реальных примерах из работ [3–8], что вместе с принципами биологии клетки [10] позволит представить структуру и функцию наследования путём перемешивания клеточных родословных в рамках представлений современной биологии клетки. Какие из предложенных идей послужат основой развития фундаментальной биологии, – решит время. Цель моего доклада – приблизить это время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимофеев-Ресовский Н.В. Генетика, эволюция, значение методологии в естествознании. Лекции, прочитанные в Свердловске в 1964 году. Екатеринбург: Токмас-Пресс, 2009. 240 с.
2. McClintock B. // Science. 1984. Vol. 226 (4676). P. 792–801.
3. Shapiro J.A. // Annals NY Acad. Sci. 2019. Vol. 1447 (1). P. 21–52.
4. Bonduriansky R., Day T. Extended heredity: a new understanding of inheritance and evolution. Princeton University Press, 2018. 305 p.
5. Ryan F.P. // Apmis. 2016. Vol. 124 (1–2). P. 11–19.
6. Villarreal L.P., Witzany G. // Annals NY Acad. Sci. 2019. Vol. 1447 (1). P. 5–20.
7. Jablonka E., Noble D. // Current Opinion in Systems Biology. 2019. Vol. 13. P. 52–58.
8. Barbieri M. Code Biology: A New Science of Life // A New Science of Life. Springer. 2015. 236 p.
9. The Routledge Handbook of Emergence / Ed by S. Gibb, R. Hendry, T. Lancaster. Taylor & Francis Group, 2019. 420 p.
10. Белобров П.И. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2017. № 2 (1). С. 159–163.
11. Belobrov P.I. // Joint IMEKO TC1-TC7-TC13-TC18 Symposium, July 2–5, St. Petersburg, Russia. 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://molpit.org/page/116>
12. The Integrated Mitotic Stem Cell. [Электронный ресурс]. URL: <https://imsc.allencell.org/> by the Allen Institute for Cell Science. 2019. Learn about this cellular model and then explore it on your own.

КАК СТАТЬ МУЖЧИНОЙ

А.И. Ким

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12
E-mail: ums-biofac@mail.ru*

Рассматриваются различные современные аспекты вопроса детерминации пола у человека. Несмотря на ключевую роль гена *SRY*, которая в настоящее время хорошо изучена, роль других генов, а также генетических элементов остаётся во многом ещё не понятной. Исследовать функции таких генов можно путем анализа их мутаций или потери функции, вызванной эпигенетическими или иными причинами.

Представлены биологические, генетические, физиологические, биохимические и клинические данные, проливающие свет на разные нюансы формирования пола. В том числе приводятся сведения об отклонениях от нормального развития пола, такие как гермафродитизм, псевдогермафродитизм, тестикулярная феминизация, химеризм, «геведоче» и другие, и рассматриваются причины их возникновения. Рассматривается вклад родителей разного пола в изменчивость их потомства. Закономерности биологии развития, генетические и эпигенетические изменения делают этот вклад неодинаковым.

МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ РИСА В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

П.И. Костылев

*Аграрный научный центр «Донской», 347740, Российская Федерация, Ростовская обл., г. Зерноград, Научный городок, 3
E-mail: p-kostylev@mail.ru*

Увеличение продуктивности риса всегда являлось главной целью селекционных программ. Потенциальная продуктивность новых сортов достигла максимума в 10–12 т/га, однако реальная урожайность значительно меньше из-за различных биотических и абиотических стресс-факторов, являющихся основными препятствиями для увеличения производства. Главными стресс-факторами для риса являются засоление, наводнения, холод, засуха, болезни, вредители и сорняки. Поэтому перенос генов устойчивости в генотипы основных сортов риса является актуальным. Применение инструментов биотехнологии вносит значительный вклад в идентификацию генов и их включение в новые сорта.

Цель исследований – создание с использованием ДНК-маркеров и ПЦР-анализа исходного материала риса для селекции высокопродуктивных сортов, устойчивых к стресс-факторам среды: засолению почвы, длительному затоплению водой, пирикулярнозу.

Исходный материал: три донора устойчивости к засолению: IR-74099, IR-52713 and NSIC Rc 106; четыре донора устойчивости к затоплению (Sub 1A): BR-11, CR-1009, TDK-1, Inpara-3; и пять доноров устойчивости к пирикулярнозу: C101(Pi-1), C101-A-51 (Pi-2), C101-Lac (Pi-1, Pi-33), Moberesap (Pi-b), IR-58 (Pi-ta). Реципиентами были сорта Новатор, Боярин и Вираз.

Идентификацию генов проводили методом молекулярного маркирования на основе ПЦР с использованием специфичных праймеров.

Болезни риса могут нанести значительный ущерб. К наиболее опасным относится пирикулярриоз. Одна из результативных стратегий получения сортов риса с длительной устойчивостью к патогенам – объединение в одном генотипе нескольких генов со своим вкладом по данному признаку. Использование молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами, обеспечивающими устойчивость растений к патогену, облегчает селекционную работу в данном направлении. На основе использования технологии ДНК-маркерной селекции нами проведено введение пяти генов устойчивости к пирикулярриозу в отечественные сорта риса, адаптированные к агроклиматическим условиям рисосеяния юга России. Серия проведённых скрещиваний позволила получить линии риса на основе сортов Боярин и Вираз с пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b в гомозиготном состоянии.

На первом этапе работы в 2003 г. нами были скрещены сорта Боярин и Вираз с донорами генов устойчивости к пирикулярриозу Pi 1, Pi 2, Pi 33 по шести комбинациям. Во втором поколении были выделены лучшие формы. После анализа во ВНИИ риса среди этих растений с помощью маркеров выделили те, которые несли доминантную аллель гена устойчивости в гомозиготном состоянии. На втором этапе в 2007 г. они были скрещены между собой для объединения всех трёх генов в одном генотипе: (Pi2 x Вираз) x (Pi1 + 33 x Боярин). В 2008 г. получены формы F₂, имеющие все три гена, проведена их хозяйственно-биологическая оценка. На третьем этапе работы, когда появились доноры генов Pi-ta и Pi-b, в 2010 г. была проведена гибридизация с ними форм, совмещающих в генотипе гены Pi-1, Pi-2, Pi-33 для получения 5-генных форм. Лучшие гибридные растения в 2012 г. проанализировали по маркерам ДНК во ВНИИСБ и НИИ биологии. Удалось выделить два образца риса, несущие доминантные аллели Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b, Pi-ta в пяти локусах в гомозиготном состоянии. Линия 2 скороспелая, созревает за 110 дней, низкорослая (80 см), со средней метелкой (15 см). Линия 19 – среднеспелая, период до созревания 120 дней, более высокорослая (100 см), с крупной длинной метелкой (22 см).

Одна пятая часть орошаемых земель в мире испытывает неблагоприятное воздействие засоления почвы. Снижение урожайности на засоленных почвах может быть преодолено путём создания сортов риса с толерантностью к засолению, которую на разных стадиях роста обеспечивают несколько независимых генов, основным из которых является *Saltol*.

Нами получены гибриды сорта Новатор с азиатскими солеустойчивыми сортами риса, несущими гены *Saltol*. Анализ ДНК 83 лучших растений F₂ с хорошо вызревшим зерном показал, что расщепление по генам *Saltol* было неправильным. У гибрида NSIC Rc 106 × Новатор расщепление по гену *Saltol* происходило в соотношении 15 ss: 13 Ss: 2 SS; у IR-52713 × Новатор – 9 ss:18 Ss: 2 SS, у IR-74099 × Новатор – 14 ss: 8 Ss: 2 SS, т.е. отклонялось от 1: 2: 1. Преобладали растения с рецессивными аллелями гена и гетерозиготы, а солеустойчивых доминантных гомозигот было меньше ожидаемого количества. Это связано со сцеплением генов *Saltol* с неблагоприятными для растений в наших условиях генами: фоточувствительностью, позднеспелостью, осыпаемостью колосков, остистостью и тем, что выборка была нерепрезентативной вследствие искусственного отбора. Выделены лучшие формы.

В мире большие площади земли подвержены наводнениям, при длительности которых более двух недель рис погибает. Был найден ген *Sub1*, который способствует толерантности к погружению. В России этот ген можно использовать для создания сортов, устойчивых в фазу прорастания к большому слою воды, при котором погибают просянки, что станет эффективным способом защиты риса от сорных растений без гербицидов.

У гибридов, полученных от скрещивания сорта Новатор с донорами гена устойчивости к затоплению *Sub1* в F₂ наблюдали огромный спектр расщепления по таким признакам, как вегетационный период, высота растений, длина и форма метёлки, количество колосков, остистость. У гибрида BR-11 x Новатор из 20 проанализированных растений ген *Sub1A* присутствовал у девяти, т.е. в соотношении 9:11, хотя при моногибридном расщеплении оно должно было быть 15:5. У CR-1009 × Новатор расщепление прошло в соотношении 18:2, т.е. почти все отобранные растения имели ген *Sub1A*. У Inbara-3 × Новатор и TDK-1 × Новатор было соотношение 14:6,

или примерно 3:1, т.е. близко к менделевскому. Отклонения в расщеплениях двух комбинаций можно объяснить влиянием отбора и сцеплением генов. Образцы с целевыми генами репродуцированы на опытной станции «Пролетарская» Ростовской области, где из них отобраны лучшие растения F₃–F₅.

ДИНАМИКА ПРОФИЛЯ МОДИФИКАЦИЙ ЦИТОЗИНА В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ МЫШИ

К.А. Лепихов

*Университет земли Саар, 66123, Германия, г. Саарбрюккен
E-mail: k.lepikhov@mx.uni-saarland.de*

Метилирование цитозина в CG динуклеотидной последовательности является важной универсальной составляющей эпигенетической регуляции активности генома млекопитающих и большинства других организмов. В процессе развития одноклеточная зигота преобразуется в полностью сформированный организм мыши (и любого другого млекопитающего), в котором насчитываются миллиарды клеток более трёх сотен разного типа, которые организованы в высокоспециализированные органы. Подобное динамическое разнообразие клеточных функций возможно благодаря многоуровневой эпигенетической регуляции активности генома, первичная структура которого остаётся неизменной в практически всех клетках организма на всех стадиях развития.

Метилирование ДНК претерпевает особенно значительные изменения на стадии формирования гамет в эмбрионе и в до-имплантационный период эмбрионального развития. Используя эмбрионы мышей в качестве объекта исследований, мы пытаемся проследить эпигенетические события, связанные с перепрограммированием эпигенетического кода на уровне модификаций ДНК, а также понять и получить возможность модулировать движущие механизмы наблюдаемых явлений. Особенно интригующим феноменом остаётся процесс деметилирования ДНК, который активен как раз на стадиях интенсивных эпигенетических и морфогенетических преобразований.

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ МЕХАНИЗМОВ ЗАПАСАНИЯ БЕЛКА У РАСТЕНИЙ

А.А. Нижников^{1,2}

¹Лаборатория протеомики надорганизменных систем, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), 196608, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Подбельского ш., 3

²Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

E-mail: lab7@arriam.ru

Запасные белки семян представляют ключевой источник аминокислот для эмбриона растения, а также являются важнейшим компонентом рациона питания человека. Семена растений переживают длительную естественную дегидратацию и неблагоприятные условия, поэтому сохранение структуры и свойств запасных белков является критическим фактором для выживания

эмбриона. В отличие от механизмов компактизации и обеспечения стабильности и целостности генома в клетках семян, молекулярные механизмы стабилизации белков семян изучены недостаточно. Последние данные, полученные нашим исследовательским коллективом, показывают, что структура запасных белков семян соответствует амилоидной, т. е. эти белки образуют фибриллы с упорядоченной структурой и уникальными физико-химическими свойствами.

В настоящем докладе рассмотрены особенности структурной организации запасных белков *in vivo* и *in vitro*, их физико-химические свойства, взаимодействие с ферментами пищеварительного тракта, а также динамика сборки и разборки полимерных комплексов, образуемых запасными белками семян. Также представлен обзор биоинформатических данных по встречаемости белков с потенциально амилоидогенными участками в протеомах наземных растений, а также по анализу сходства структуры амилоидогенных белков растений с белками других организмов, включая прокариот. В целом, на основании полученных нами данных можно заключить, что амилоидогенез запасных семян, по-видимому, представляет собой генерализованный механизм поддержания структурной целостности запасных белков семян наземных растений.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 17-16-01100.

АНТИМУТАГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИКОВ

Е.В. Празднова

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: ldsz@rambler.ru*

В качестве основных механизмов, обеспечивающих положительное действие пробиотиков на организм хозяина рассматривают: 1) антагонизм с патогенной микрофлорой; 2) стимуляцию специфического и неспецифического иммунитета; 3) стимуляцию роста нормальной микрофлоры; 4) выделение пищеварительных ферментов; 5) продукцию аминокислот и витаминов; 6) деструкцию ксенобиотиков (аллергенов, мутагенов), а также веществ, затрудняющих усвоение пищи. Отдельные работы свидетельствуют о том, что пробиотики оказывают влияние на психическое состояние хозяина [1], вмешиваются в регуляцию обмена веществ, работу гормональных систем [2], экспрессию генов [3] и другие регуляторные механизмы. В настоящее время всё чаще говорят о системном действии пробиотиков. Но термин «системный» означает в том числе, что эффект не может быть объяснён простым суммированием множества мелких эффектов. В большинстве случаев действие пробиотиков описывают именно таким образом – как сумму антиоксидантного, антагонистического и других эффектов. Системный же принцип предполагает воздействие на критические точки, регуляторы, причем данное воздействие должно передаваться внутри клетки по принципу каскадного усиления сигнала, что объясняло бы эффекты весьма незначительных доз. В живых организмах действительно присутствуют системы, управляемые сравнительно простыми «переключателями» – регуляторные каскады, опероны генов и т.п. Через эти системы пробиотические бактерии могут взаимодействовать как с остальными членами микробного сообщества, так и с хозяевами. Согласно современной системе взглядов, межвидовой антагонизм бактерий основан не только на стратегиях тотального уничтожения антагониста, но и включает в себя более тонкие механизмы, выработанные за миллионы лет межвидового соперничества, включая механизмы регуляции его метаболизма.

В качестве процессов-мишеней для вышеописанных эффектов в прокариотической клетке можно рассмотреть следующие:

1) SOS-репарация и экспрессия генов ответа на стрессовые реакции. SOS-ответ у бактерий является важнейшим механизмом мутагенеза. Как было показано в наших работах [4], бескле-

точный препарат пробиотических штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 и *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 способен снижать SOS-ответ у *E. coli*, а также в несколько раз уменьшать число антибиотикорезистентных мутантов у грамположительных и грамотрицательных организмов. Таким же свойством обладал и ряд штаммов *Lactobacillus* [5]. Выделенная при помощи ионообменной хроматографии фракция метаболитов показала устойчивость к температурам до 80 °C и протеиназам, а также положительную реакцию на наличие пептидной связи. Фильтрация фракции сквозь фильтр с порами до 10 кДа не приводило к снижению активности, что свидетельствует о небольшом размере целевых молекул.

2) «Чувство кворума». Данный механизм обеспечивает биооплёночобразование, проявление патогенных свойств и устойчивость к факторам среды у множества бактерий. Кроме того, известно, что в биооплёнках скорость мутагенеза возрастает на два порядка. В качестве агентов, нарушающих «чувство кворума», рассматриваются, в частности, пептиды природного происхождения [6].

3) Горизонтальный перенос генов. Этот процесс, будучи связан с SOS-ответом на уровне регуляции (через RecA-белок), также является важным механизмом адаптации к антимикробным агентам.

В эукариотических клетках, согласно имеющимся данным, мишенями могут быть:

1) Процессы в митохондриях, в том числе генерация АФК и их инактивация, а также экспрессия митохондриальных генов. Появляются данные о том, что митохондрии, являющиеся, согласно общепринятым представлениям, потомками симбиотических бактерий, выполняют в клетках роль регуляторного «командного центра» [7]. Пробиотики же, как выясняется в последние годы, способны активно взаимодействовать с митохондриями хозяина [8].

2) Экспрессия ядерных генов-регуляторов, запускающих такие каскады, как, например, p38 MAP-киназный путь [9, 10]. Чаще всего оказывается затронута экспрессия генов, ответственных за ответ на стрессовые воздействия, в частности, окислительный стресс. Активация данных каскадов способствует улучшению адаптации организма к стрессовым условиям и может приводить к увеличению продолжительности жизни [10]. Стоит отметить, что данные эффекты отмечались как при действии живых клеток, так и под влиянием бесклеточных препаратов [9].

В нашей работе по изучению биологической активности двух штаммов *Bacillus*, проводившейся на курах, было обнаружено, что препарат на основе штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 вызывал снижение числа повреждений митохондриальной ДНК (на 34 % по сравнению с контролем). Было установлено, что пробиотическая добавка увеличивает транскрипционную активность генов синтеза вителлогенина. Кроме того, скорость репродуктивного старения цыплят по сравнению с контролем замедлилась на 2,1 %. Наблюдалось также улучшение ряда физиологических и биохимических показателей [11].

Молекулы, которые могли бы обеспечить вышеописанные эффекты, должны обладать рядом свойств: 1) небольшие размеры (способность проникать сквозь мембраны); 2) устойчивость к протеиназам и другим факторам среды; 3) сродство к белковым рецепторам или сходство с белковыми факторами, участвующими в регуляторных каскадах; 4) существование во множестве изоформ и возможность быстрой перестройки структуры.

Свойства выделенных нами метаболитов позволяют заключить, что это пептиды небольшого размера. Для рода *Bacillus* характерны такие вторичные метаболиты, как нерибосомально синтезируемые пептиды (НРП). Они не превышают нескольких кДа в размерах, не денатурируют при воздействии температуры, не гидролизуются протеиназой К. Такая устойчивость обеспечивается наличием в структуре нетипичных аминокислот и стереоизомеров [12]. Чаще всего НРП рассматриваются как антимикробные и противогрибковые агенты, однако в последнее время появляются данные об участии их в регуляторных процессах [13]. НРП соответствуют всем вышеприведенным критериям. Следует отметить, что олигопептиды как регуляторные молекулы характерны для большинства живых организмов. Пептиды, вырабатываемые в том числе и человеческим организмом, имеют черты сходства с НРП [9]. Это позволяет предположить, что данные молекулы могут взаимодействовать с рецепторами со сходной конфигурацией.

Таким образом, пробиотические свойства бактерий родов *Bacillus* и *Lactobacillus* могут обеспечиваться, помимо общеизвестных механизмов, взаимодействиями с регуляторными процессами в геномах микроорганизмов-антагонистов (в частности, ингибированием SOS-ответа и снижением приспособляемости к антимикробным агентам), а также влиянием на экспрессию генов хозяина, в том числе регуляцию интенсивности окислительного стресса, и уменьшение частоты мутагенеза. Одним из агентов подобных взаимодействий, по-видимому, являются олигопептиды нерибосомального происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Petra A. I. et al. // *Clinical therapeutics*. 2015. Vol. 37, №. 5. P. 984–995.
2. Zhou Y., Li S., Pang Q., & Miao Z. // *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019. Vol. 11. P. 1–7.
3. Li B., Evivie S.E., Lu J. et al. // *Food & function*. 2018. Vol. 9 (12). P. 6586–6598.
4. Prazdnova E.V. et al. // *Current microbiology*. 2019. Vol. 76, №. 3. P. 312–319.
5. Chistyakov V. et al. // *Biosensors*. 2018. Vol. 8, №. 1. P. 25.
6. Ribeiro S.M. et al. // *Pharmacology & therapeutics*. 2016. Vol. 160. P. 133–144.
7. Zolotukhin P.V. et al. // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. Vol. 81, №. 4. P. 329–337.
8. Saint-Georges-Chaumet Y. et al. // *Cellular and Molecular Biology*. 2015. Vol. 61, №. 4. P. 121–124.
9. Savustyanenko A.V. // *Actual Infectology*. 2016. № 2 (11). P. 35–44.
10. Nakagawa H., Shiozaki T., Kobatake E. // *Caenorhabditis elegans. Aging cell*. 2016. Vol. 15 (2). P. 227–236.
11. Prazdnova E.V. et al. // *Beneficial microbes*. 2019. Vol. 10, №. 4. P. 395–412.
12. Betzel C., Singh T.P., Visanji M. // *The Journal of Biological Chemistry*. 1993. Vol. 268 (21). P. 15854–15858.
13. Vasilchenko A.S., Rogozhin E.A. // *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 1160.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА В ЮЖНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

А.В. Усатов, М.С. Макаренко, К.В. Азарин, Н.В. Маркин, Н.С. Колоколова

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: usatova@mail.ru

Кафедра генетики в Ростовском госуниверситете была организована в 1937 г. С первых дней основания идеология кафедры была направлена на развитие научных тем, реализуемых в НИИ биологии РГУ. Одно из таких направлений, благодаря которому кафедра и институт приобрели известность, связано с изучением генетики хлорофильных мутантов подсолнечника. Это направление основал профессор И.Ф. Лященко, первые работы которого по изучению спонтанных хлорофильных мутаций у подсолнечника были представлены в ДАН СССР академиком Н.И. Вавиловым [1, 2]. Широко используя инбридинг для исследования хлорофильных мутаций, И.Ф. Лященко с сотрудниками накопил огромный материал, представляющий интерес не только для теории генетики и физиологии растений, но и для практической селекции.

Приход в НИИ биологии ученика И.Ф. Лященко Ю.Д. Белецкого открыл новый этап в развитии генетических исследований подсолнечника в Ростовском университете. В 1969 г. он совместно с Е.К. Разорителевой и Ю.А. Ждановым сообщили о выдающемся открытии – эффективном методе, с помощью N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) в сотни раз повышающим индукцию внеядерных хлорофильных мутаций у подсолнечника [3], получившем в дальнейшем высокую оценку у зарубежных специалистов. Это открытие явилось стимулом для сотрудников нашей лаборатории к глубокому изучению закономерностей мутационного процесса в хлоропластах и генетико-физиологического

анализа внеядерных мутантов подсолнечника. После скоропостижной смерти Ю.Д. Белецкого в 1991 г. большую методическую и организационную поддержку этому направлению генетики растений оказал директор НИИ биологии, заведующий кафедрой генетики Е.П. Гуськов. В результате многолетних исследований НММ – мутагенеза подсолнечника – были выявлены закономерности эффективной индукции пластидных хлорофильных мутаций при воздействии мутагеном в малых дозах на прорастающие семена в определённые временные интервалы развития [4, 5]. Исследованы модифицирующие эффекты ряда химических и физических факторов на эффективность индуцированного НММ пластидного мутагенеза [6–8]. Получены сотни линий мутантов. Гибридологическим, молекулярно-генетическим и ультраструктурным анализом установлено, что индуцированные хлорофильные мутации удовлетворяют критериям пластидной наследственности. Для них характерно однородительское (материнское) наследование мутантного признака, постоянное соматическое расщепление, дефекты строения и функции хлоропластов, наличие гетеропластидных клеток, различия в структуре ДНК нормальных и мутантных пластид [9–12]. Для дальнейшего изучения отобраны и в настоящее время продолжают культивироваться несколько десятков наиболее типичных внеядерных мутантных форм, которые включены в уникальную генетическую коллекцию ЮФУ. Уникальность коллекции заключается в том, что все пластидные мутанты подсолнечника получены на единой генетической основе инбредной линии 3629.

Анализ организации и изменчивости геномов растений имеет как фундаментальный, так и прикладной аспект. Точная идентификация исходного материала, его конкретных признаков на всех этапах селекционного процесса актуальна в работе селекционеров. Совместно с сотрудниками ДОС ВНИИМК мы генотипировали с помощью SSR-праймеров материнские линии подсолнечника с целью дифференциации селекционного материала [13], создали прогностическую модель урожайности гибридов F1 на основе генетических дистанций между родительскими линиями, рассчитанных с помощью SSR-локусов ядерного генома [14], экспериментально определили информативные ДНК маркеры устойчивости подсолнечника к наиболее распространённым на юге РФ трём расам (330, 710 и 730) ложной мучнистой росы и заразихе (включая расы E, G и H) [15], разработали и апробировали мультиплексную ПЦР тест-систему на основе последовательности митохондриальной *orfH522* и ядерного маркера гена *Rfl* HRG01/OPK13, позволяющую идентифицировать ЦМС PET1 и Rf-линии [16].

В настоящее время в коммерческом производстве семян подсолнечника доминируют гетерозисные гибриды, полученные на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) только одного типа PET1, открытого П. Леклерком ещё в 1966 г у межвидового гибрида *H. petiolaris* Nutt. × *H. annuus* L. Такая генетическая унификация цитоплазмы возделываемых гибридов может привести к различным негативным явлениям, например, массовым эпифитотиям. Более того, у подсолнечника на сегодняшний день выделено более 70 типов ЦМС и только для одного PET1 были определены специфичные реорганизации структуры мтДНК, связанные с ЦМС фенотипом. В связи с этим мы совместно с В.А. Гавриловой (ВИР) и М.Д. Логачевой (ФББ МГУ) исследовали структурно-функциональную организацию хлоропластных и митохондриальных геномов у фертильной линии HA89 и её стерильных аналогов HA89(PET1), HA89(PET2), HA89(ANN2), HA89(MAX1) из коллекции ВИР. ЦМС линии были получены на основе однолетних *H. petiolaris* (PET1, PET2), *H. annuus* (ANN2) и многолетнего *H. maximillianii* (MAX1) видов рода *Helianthus* L. Сравнительный анализ хлДНК фертильной линии HA89 и её стерильных аналогов позволил локализовать 447 полиморфных сайта, в том числе 57 SSR, 315 SNP и 75 INDEL. 119 из 315 SNP обнаружены в кодирующих участках генов, при этом 58 SNP приводят к изменению аминокислотных последовательностей кодируемых белков [17, 18]. Исследование мтДНК продемонстрировало у стерильных аналогов наличие крупных реорганизаций геномов, в том числе 1 инверсию, 12 инсерций, 15 транспозиций и 16 делеций, а также 560 полиморфных сайтов, в том числе 33 SSR, 463 SNP и 64 INDEL. Размер митохондриальных геномов аллоплазматических линий с различными типами ЦМС значительно отличался по сравнению с фертильным аналогом. Изменения структуры мтДНК привели к возникновению 15 новых открытых рамок считывания. Биоинформационный анализ полипептидов, кодируемых активно транскрибируемыми открытыми рамками считывания, возникшими в результате реорганизаций

мтДНК, позволил предположить, что ЦМС типа РЕТ2 непосредственно связана с *atp9*-химерными генами *orf228* и *orf285*, ЦМС типа МАХ1 – с *atp6*-химерным геном *orf1287*, ЦМС типа АNN2 – с *atp6*-химерным геном *orf1197* [19, 20]. Аннотированные полногеномные последовательности хлДНК и мтДНК ЦМС линий были депонированы в международную базу данных NCBI.

Поскольку ЦМС растений представляет собой не только прекрасную модель, для изучения взаимодействия ядерных и цитоплазматических генетических систем клетки, но и эффективную мутацию для производства гибридных гетерозисных семян, дальнейший перевод лучших селекционных линий на новые типы ЦМС позволит избежать в будущем рисков, связанных с унификацией цитоплазмона у коммерческих гибридов подсолнечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лященко И.Ф. // ДАН СССР. 1940. Т. XXVII. № 3. С. 824–826.
2. Лященко И.Ф. // ДАН СССР. 1940. Т. XXVII. № 8. С. 827–828.
3. Белецкий Ю.Д., Разорителева Е.К. Жданов Ю.А. // ДАН СССР. 1969. Т. 166. С. 1425–1426.
4. Белецкий Ю.Д., Усатов А.В., Разорителева Е.К. // ДАН СССР. 1990. Т.313. №3. С. 716–718.
5. Усатов А.В., Таран С.Ф., Гуськов Е.П. // Генетика. 1995. Т. 31. № 2. С. 222–227.
6. Гуськов Е.П., Маркин Н.В., Усатов А.В., Машкина Е.В. // Генетика. 2001. Т. 37. № 3. С. 336–343.
7. Усатов А.В., Машкина Е.В., Маркин Н.К., Гуськов Е.П. // Генетика. 2001. Т. 37. № 12. С. 1650–1656.
8. Усатов А.В., Машкина Е.В., Гуськов Е.П. // Генетика. 2005. Т. 41. № 1. С. 63–70.
9. Усатов А.В., Разорителева Е.К., Машкина Е.В., Улитчева И.И. // Генетика. 2004. Т. 40. № 2. С. 248–255.
10. Усатов А.В., Рассадина В.В., Аверина Н.Г. и др. // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 2. С. 175–183.
11. Markin N., Usatov A., Logacheva M. et al. // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2016. Vol.12. № 1. P. 72–78.
12. Makarenko M., Usatov A., Markin N. et al. // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2017. Vol.13. № 4. P. 189–194.
13. Markin N.V., Usatov A.V., Vasilenko V.N. et al. // American Journal Agricultural and Biological Sciences. 2016. Vol. 11. № 1. P. 13–18.
14. Usatov A.V., Klimenko A.I., Azarin K.V. et al. // American Journal Agricultural and Biological Sciences. 2014. Vol. 9. № 3. P. 270–276.
15. Usatov A.V., Klimenko A.I., Azarin K.V. et al. // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2014. Vol. 10. № 2. P. 136–140.
16. Markin N., Usatov A., Makarenko M. et al. // Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. 2017. Vol. 53 № 2. P. 69–75.
17. Azarin K., Makarenko M., Usatov A. et al. // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2018. Vol. 14. № 1. P. 39–47.
18. Azarin K., Makarenko M., Usatov A. et al. // Data in Brief. 2019. Vol. 25. № 104072.
19. Makarenko M.S., Kornienko I.V., Azarin K.V. et al. // Peer J. 2018. № 7. 6:e5266.
20. Makarenko M.S., Usatov A.V., Tatarinova T.V. et al. // BMC Plant Biology. 2019. Vol. 19 (Suppl. 1):51. P. 41–47.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ КАК ИСТОКИ И ПРЕДЕЛЫ СУЩЕСТВОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА

Н.К. Янковский^{1,2}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: yankovsky@vigg.ru

Предки человека и шимпанзе произошли от единого вида около 6 млн лет назад в Африке. Около миллиона лет назад человек как вид освоил огонь и обитал уже и в Передней Азии – там найдены очаги для приготовления пищи. Семьсот тысяч лет назад сформировалась группа людей, которые навсегда ушли из Африки и разделились на две ветви («денисовский человек» и «неандертальцы»), расселившиеся по всей Евразии. Ветвь современного человека (*Homo sapiens*) сложилась в Африке 120–200 тыс. лет назад и затем также заселила Евразию. В течение десятков тысяч лет представители всех трёх ветвей человека жили во многих местах Евразии в соседстве друг с другом. Пары индивидов каждой из этих трёх ветвей человека во всех сочетаниях производили жизнеспособное гибридное потомство – сейчас это мы сами и есть. У современных европейцев до четырёх процентов генома (генетический текст, представленный молекулой ДНК) имеет неандертальское происхождение, а почти пятая часть генома современных филиппинцев получена когда-то от денисовцев. Предполагается что аллели приспособленности к высокогорью у народов Тибета денисовского происхождения. Современный человек впитал полезные мутации всех трёх ветвей предков и заселил планету от экватора до высоких широт на всех континентах.

Около 10 тысяч лет тому назад человек в разных местах мира одомашнил сначала растения, а через несколько тысяч лет и животных. Урожай возделываемых растений выше и стабильнее, чем у дикоросов и это ускорило рост численности населения. Посев, сбор и хранение урожая привели к оседлости, а это сократило в два раза период между родами, и население стало расти ещё быстрее. За 10 тысяч лет нас стало более 7,5 млрд человек, и, чтобы прокормить себя, мы засеваем почти половину земли доступной для земледелия. Урожайность будет расти, но этому есть предел. Численность человечества расти продолжает. Есть ли этому предел, нам предстоит узнать. В мире голодают 800 млн человек, 13 млн человек в год умирает от голода. Это вторая по частоте причина смерти в мире (первая – сердечно-сосудистые, третья – рак). Если бы численность человечества выросла сейчас вдвое, то нам пришлось бы засеять остающуюся пока свободной половину пашни. Другой пашни на земле нет. Перспектива – тотальный голод как предел существования человеческого общества?

Выходом является получение органического вещества из углекислого газа воздуха вообще без пашни и света. Энергия для этого тоже конечно нужна, но вместо фотона света можно использовать электрон «из розетки». Это умеют делать некоторые бактерии, растущие прямо на катоде, погружённом в раствор солей. Продукция органики при этом в расчёте на электрон на порядок выше, чем у растений в расчёте на фотон. Это дополнительный путь производства пищи. Сегодняшние источники энергии не позволяют производить такую пищу рентабельно, но наука, вероятно, может их создать! Возможно, сначала это будет пища для животных, а может быть и для самих растений. Генная инженерия на определённых бактериях уже сейчас позволяет сконструировать путь синтеза практически любой «съедобной» молекулы из углекислого газа, что занимает, правда, много лет. Но если это вопрос выживания человечества, то не пора ли это новое направление науки поддержать?

Другим выходом является сокращение и остановка роста численности человечества. Происходит ли это? Если да, то когда этот процесс закончится? Все ли страны и народы захотят и смогут пойти по этому пути? Умрем ли мы сначала от голода? Создадим ли новый вечный хлеб? Или станем первым видом на земле, которому всего хватает, а он сам сознательно решил и смог прекратить рост своей численности и будет существовать ещё миллионы лет, как и многие другие виды млекопитающих на Земле?...

КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА. ПЕРСОНАЛИЗОВАННАЯ МЕДИЦИНА

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ p22phox НАДФН-ОКСИДАЗЫ (CYBA) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА У ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

Ю.Э. Азарова¹, Е.Ю. Клёсова¹, В.А. Азарова², А.И. Конопля¹, А.В. Полоников¹

¹Курский государственный медицинский университет, 305041, Российская Федерация, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

²Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, 305016, Российская Федерация, г. Курск, ул. Пирогова, 14

E-mail: azzzzar@yandex.ru; klesova.1995@mail.ru; valentazar@yandex.ru; konoplya51@mail.ru; polonikov@rambler.ru

Окислительный стресс играет ключевую роль в развитии сахарного диабета 2-го типа (СД2), заболевания, которым в настоящее время в мире страдают 425 млн человек. НАДФН-оксидаза служит главным эндогенным источником супероксид-радикала и представляет собой мультиферментный комплекс, включающий несколько субъединиц (рис.). Вектор исследований причин дисбаланса в редокс-системе был долгое время смещён в сторону изучения дефицита антиоксидантов, в то время как гиперактивность генов проокислительной системы гораздо реже рассматривалась как фактор риска развития свободнорадикальной патологии, к которой относится и СД2.

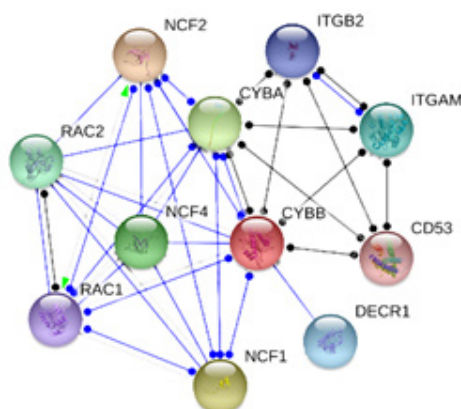


Рис. Функциональные партнеры CYBA:

CYBA – легкая цепь цитохрома b-245; CYBB – тяжёлая цепь b-245; NCF1 – нейтрофильный цитозольный фактор 1; NCF2 – нейтрофильный цитозольный фактор 2; NCF4 – нейтрофильный цитозольный фактор 4; RAC1 – субстрат 1 родственник Ras ботулинового токсина; RAC2 – субстрат 2 родственник Ras ботулинового токсина; DECR1 – 2,4-диеноил-КоА редуктаза; ITGB2 – интегрин бета-2; ITGAM – интегрин альфа-M; CD53 – лейкоцитарный поверхностный антиген.

Прямые линии обозначены функциональные взаимодействия между белками
(данные STRING: <https://string-db.org/>)

Цель исследования – изучить ассоциации полиморфизмов гена альфа-цепи цитохрома b-245 (p22-PHOX) rs7195830 (G>A), rs8854 (C>T), rs9932581 (C>T) и rs4673 (G>A) с риском развития сахарного диабета 2-го типа у жителей Центральной России.

В исследование включено 1022 больных сахарным диабетом 2-го типа (средний возраст 61,1±7,2 года), получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи с ноября 2015 по декабрь 2018 года. Группу контроля составили 1064 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой пациентов. У всех больных и здоровых проводили забор 5 мл крови натощак в вакуумные пробирки Vacuette с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Геномную ДНК выделяли колоночным методом на автоматической станции QiaCube (QIAGEN). Генотипирование полиморфизмов гена *CYBA* rs7195830 (G>A), rs8854 (C>T), rs9932581 (C>T) и rs4673 (G>A) проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролётном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4 (Agena Bioscience). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью онлайн программы SNPStats (<https://www.snpsstats.net/>).

Частоты генотипов rs7195830, rs8854 и rs9932581 *CYBA* пациентов с СД2 не отличались от таковых в группе контроля ($p>0,05$). Тем не менее, нами была отмечена тенденция к увеличению частоты генотипа T/T rs8854 среди больных СД2 ($p=0,079$). Генотип A/A гена *CYBA* (rs4673, G>A) ассоциировался с повышенным риском развития заболевания (OR 1,5, 95 %CI 1,12–2,00, $p=0,0062$, рецессивная модель). Выявленная ассоциация сохранила значимость и после введения поправки на пол, возраст и индекс массы тела (OR_{corr} 1,85, 95 %CI 1,23–2,78, $p_{corr}=0,0024$). Согласно данным GTEx портала (<https://gtexportal.org/>), вариантный аллель A rs4673 повышает экспрессию гена *CYBA* и таким образом провоцирует гиперпродукцию супероксид-радикалов, что может приводить к повреждению молекул-посредников сигналинга инсулина в периферических тканях с последующим развитием инсулинорезистентности, основы патогенеза СД2. Кроме того, избыток активных форм кислорода в островках поджелудочной железы может служить пусковым механизмом апоптоза и приводить к снижению функционирующей массы бета-клеток, ещё одной характерной черты СД2.

В проведённом исследовании впервые в Российской популяции установлена ассоциация полиморфизмов гена альфа-цепи цитохрома b-245 с повышенным риском развития СД2. Механизм взаимосвязи данных вариантов с заболеванием объясняется более выраженным синтезом *CYBA* НАДФН-оксидазы у носителей минорных аллелей rs4673, что способствует формированию прооксидантного статуса и повышает риск развития СД2.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ Arg16Gly и Gln27Glu гена *ADRB2* С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

А.Ю. Акпарова¹, А.А. Арипова¹, М. Садвокасова¹, М.Т. Абишев², Р.И. Берсимбай¹

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Республика Казахстан, г. Нур-Султан, ул. Сатпаева, 2

²Городская больница № 2, Республика Казахстан, г. Нур-Султан, ул. Рыскулова, 6
E-mail: ribers@mail.ru; akparova-a@yandex.kz

Бронхиальная астма (БА) – распространённое гетерогенное заболевание, характеризующееся полностью или частично обратимой обструкцией дыхательных путей. Наиболее важными проблемами,

связанными с БА, являются повышенное потребление лекарственных препаратов и их недостаточная эффективность у отдельных больных. Решение этих вопросов видится в установлении генетических и молекулярных маркеров, характеризующих эндотипы и фенотипы заболевания, способствующих подбору соответствующего персонализированного лечения.

Агонисты β 2-адренорецепторов (*ADRB2*) широко применяются для расслабления гладкой мускулатуры бронхов как наиболее эффективные и безопасные бронхолитические средства. Изучение полиморфных вариантов *ADRB2 Arg16Gly* и *Gln27Glu*, расположенных в кодирующем регионе гена, показало их ассоциацию с повышенным риском БА [1], вариабельностью ответов больных на лекарственную терапию [2], терапевтически резистентной [3], атопической [4] и тяжёлой БА [5].

Целью настоящей работы было оценить вклад *Arg16Gly* и *Gln27Glu* полиморфизмов гена *ADRB2* в развитие БА и её фенотипов в казахской популяции.

В исследование вошло 70 больных БА средней степени тяжести в возрасте от 20 до 68 лет. Все больные проживали в Казахстане не менее 5 лет и в момент забора материала находились на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Городской больницы № 2, г. Нур-Султан. Контрольная группа состояла из 79 здоровых лиц.

Геномная ДНК была выделена из образцов периферической крови больных БА и контрольной группы с использованием наборов реагентов «ДНК-Экстрен-1» (ООО «Синтол», Москва, Россия). Исследование полиморфных вариантов гена *ADRB2 (Arg16Gly - rs1042713; Gln27Glu - rs1042714)* проведено методом RT-PCR с применением наборов реагентов ООО «Синтол», Москва, Россия.

Различия основных характеристик участников исследования определены с применением непараметрического Т-теста Стьюдента и χ^2 -теста. Отношение шансов (OR), 95 % доверительные интервалы и *p* подсчитаны для оценки различий между частотой генотипов между случаями и контролем. Статистическая достоверность устанавливалась при *p* < 0,05.

Изучение полиморфизмов *Arg16Gly* и *Gln27Glu* гена *ADRB2* проведено у 149 человек. Частоты генотипов *Arg16Gly* и *Gln27Glu* SNPs гена *ADRB2* больных БА и контрольной группы соответствовали равновесию Харди-Вайнберга. Не выявлено значимых различий между распространённостью аллелей и генотипов больных БА и контрольной группы (*p* > 0,05). Обнаружено, что гаплотипы *Arg16Gly/Gln27Gln* и *Arg16Gly/Gln27Glu* чаще встречаются у больных БА по сравнению со здоровыми индивидуумами. Выявлена ассоциация аллеля *A* и генотипа *A/A* полиморфизма *ADRB2 Arg16Gly* с неконтролируемой БА (*p* = 0,02). Сравнение распределения аллелей *Arg16Gly* варианта у больных БА в различных популяциях показало, что частоты аллелей *Arg* и *Gly* в казахской популяции соответствуют частотам аллелей популяций Америки и Южной Азии.

Исследование распределения аллелей, генотипов и гаплотипов полиморфных вариантов *Arg16Gly* и *Gln27Glu* гена *ADRB2* у больных БА выявило ассоциацию гаплотипов *Arg16Gly/Gln27Gln* и *Arg16Gly/Gln27Glu* с развитием заболевания в казахской популяции. Полиморфизм *Arg16Gly* показал вовлечённость в формирование неконтролируемого течения БА и возможность его использования в качестве фармакогенетического маркера болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toraih E.A., Hussein M.H., Ibrahim A. et al. // *Frontiers In Bioscience, Elite*. 2019. Vol. 11. P. 61–78, Jan 1.
2. Finkelstein Y., Bournissen F.G., Hutson J.R., Shannon M. // *J. Asthma*. 2009. Vol. 46. P. 900–905.
3. Mironova Zh., Trofimov V., Dubina M. et al. // *European Respiratory Society. Annual Congress*. 2012. Abstract Number: 3243.
4. Чакова Н.Н., Воловик Н.О., Ниязова С.С. и др. // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2017. № 3. С. 30–34.
5. Zimiani de Paiva A.C., de Lima Marson A.F. et al. // *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2014. № 10. P. 1–9.

МУТАЦИИ ГЕНОВ *BRCA1* И *BRCA2* У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОПУЛЯЦИОННЫХ ГРУППАХ ЖИТЕЛЕЙ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА

К.А. Алиев¹, К.Д. Малый², Н.К. Малая², В.В. Олексенко¹, Г.Н. Телькиева¹

¹*Кафедра онкологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, 295051, Российская Федерация, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7*

²*Центральная научно-исследовательская лаборатория Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, 295051, Российская Федерация, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7*

E-mail: kazimaliev1986@gmail.com; kdmalykd@gmail.com

Мутация 5382insC гена *BRCA1* является ведущей мутацией, выявляемой при наследственном раке молочной железы (РМЖ) в Российской Федерации (РФ). При этом в большинстве публикаций данные, описывающие мутации в РФ, относятся к женщинам славянского происхождения. Есть основание полагать, что представительницы других этнических групп, населяющих различные регионы РФ, различаются по спектру мутаций в генах *BRCA1/2*. Целью исследования явился анализ частот встречаемости мутаций генов *BRCA1/2* у больных с клиническими признаками наследственного РМЖ, проживающих на территории Крыма.

Были изучены частоты ряда мутаций генов *BRCA1* (5382insC, 185delAG, 4154delA) и *BRCA2* (6174delT) у больных РМЖ, проходивших специализированное лечение в период с 2012 по 2019 гг. на базе ГБУЗРК «КРОКД имени В.М. Ефетова». Исследовались образцы ДНК, выделенные из крови, с помощью фенол-хлороформного метода. Определение генетического полиморфизма проводилось с помощью наборов ООО НПФ «Литех», г. Москва, в Центре коллективного пользования Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Мутации регистрировались с помощью ПЦР в реальном времени на приборе CFX-96. Проанализированы 267 образцов крови, полученных у больных РМЖ, и 242 образца крови контрольной группы (здоровых женщин со сходными демографическими данными).

Мутация *BRCA1* 5382insC обнаружена в основной группе в 7,1 % случаев, в контрольной – 0,4 %; мутация 185delAG – в 0,4 % случаев при РМЖ и не выявлена в контрольной группе; мутация 4154delA не была идентифицирована в исследуемых выборках. Мутация *BRCA2* (6174delT) обнаружена только в группе РМЖ в 0,4 % случаев. Иммуногистохимически у больных с выявленными мутациями преобладал трижды негативный биологический подтип РМЖ (88,9 %). Наблюдались выраженные различия во встречаемости мутаций в популяционных группах славян и крымских татар: все выявленные мутации наблюдались в группе славян, в то время как в группе крымских татар исследуемые мутации, несмотря на семейный анамнез, зарегистрированы не были.

Полученные данные представляют значение при выборе тактики лечения, позволяя прогнозировать особенности течения патологического процесса, и обуславливают необходимость дальнейших исследований по поиску факторов и механизмов развития онкологических процессов с учетом молекулярно-генетических особенностей в различных популяционных группах.

ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК У ПАЦИЕНТОВ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЁННОЙ GESTАЦИОННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ БЕРЕМЕННОСТЬЮ

И.А. Аллилуев, Е.В. Заикина, Е.М. Вечканов

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: alliluev@sfedu.ru

Гестационный сахарный диабет (ГСД) является одним из распространённых нарушений углеводного обмена, встречающихся во время беременности. При заболевании возникают условия для развития окислительного стресса, что объясняется увеличением субстратов для окисления, снижением активности антиоксидантных ферментов и повышением продукции активных форм кислорода (АФК) [1]. Образование АФК приводит к повреждению β -клеток островков Лангерганса, что в результате позволяет заболеванию прогрессировать. Длительное воздействие АФК может сопровождаться накоплением окислительных повреждений ДНК и изменением активности ферментов репарации ДНК [2].

Целью настоящей работы стала оценка повреждений ДНК и содержания малонового диальдегида у пациентов с физиологической и осложнённой ГСД беременностью. Критерием включения пациенток в исследование стали результаты перорального глюкозотолерантного теста, отсутствие прегестационного сахарного диабета, инфекционных заболеваний и преэклампсии. Материалом исследования служили образцы цельной венозной крови матери и артериальной крови пуповины, полученных при родоразрешении. Забор биоматериала осуществлялся в пробирки с напылением ЭДТА в ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. В исследование были включены 10 женщин с физиологической и 9 женщин с осложнённой ГСД беременностью, окончившейся родами в срок (38–40 недель беременности). Все пациентки дали информированное согласие на расширенный алгоритм обследования. Выделение лимфоцитов проводилось путем центрифугирования цельной крови в градиенте плотности фикола/верографин [3]. Содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови определяли с помощью реакции с тиобарбитуговой кислотой [4]. Уровень повреждений ДНК лимфоцитов оценивали при помощи метода ДНК-комет [5]. Для оценки статистически значимых различий использовали критерий Стьюдента. Разницу средних величин считали достоверной при $p < 0,05$.

Концентрация МДА в плазме крови женщин с физиологически протекающей беременностью составила $1,97 \pm 0,27$ мкмоль/л и $1,47 \pm 0,13$ мкмоль/л в образцах пуповины, а при беременности, осложненной ГСД, – $2,49 \pm 0,1$ мкмоль/л в плазме крови женщин и $2,48 \pm 0,13$ мкмоль/л в плазме крови пуповины, что выше значений физиологической нормы на 26 и 74 %, соответственно. Для оценки повреждений ДНК проводили измерение показателя, равного отношению длины хвоста кометы к процентному содержанию ДНК в её хвосте. Результаты демонстрируют статистически значимые отличия уровня повреждений ДНК при ГСД по отношению к показателям при физиологически протекающей беременности в 2,5 раза в крови матери и в 2,7 раза в образцах крови пуповины.

Таким образом, беременность, осложнённая ГСД, сопровождается интенсификацией повреждений ДНК наряду с повышением уровня процессов ПОЛ, что может привести к патологическому течению беременности и отразиться на материнском организме, состоянии плаценты и плода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lappas M., Hiden U., Desoye G. et al. // ANTI-OXIDANTS & REDOX SIGNALING. 2011. Vol. 15, № 12. P. 3061–3101.*
2. *Prentki M., Nolan C.J. // J. Clin. Inv. 2006. № 7. P. 1802–1812.*
3. *Boyum A. Separation of blood leucocytes, granuloocytes and lymphocytes // Tissue Antigen. 1974. № 4. P. 269–274.*
4. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.*
5. *Olive P.L., Vanath J.P. T // Nat. Protoc. 2006. № 1. P. 23–29.*

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА *Pro72Arg* ГЕНА *TP53* В РАЗВИТИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Н.М. Алнасар, М.М. Згаиби

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: Nancy.nassar1590@gmail.com; mohammed.zghaebi@gmail.com

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и другие формы атеросклеротических заболеваний по-прежнему остаются основной причиной смерти во всём мире и, по прогнозам, будут оставаться таковыми как минимум до 2030 г. [1]. ИБС – это термин, обозначающий проблемы с сердцем, вызванные сужением коронарных артерий, которые снабжают кровью сердечную мышцу [2]. Белок p53 является фактором транскрипции и регулирует экспрессию множества различных генов. Активация p53 обусловлена разнообразными стрессовыми сигналами, в том числе и гипоксией [3]. Когда гипоксия вызвана ишемией после инсульта или инфаркта миокарда, p53 индуцирует апоптоз в клетках сердечной мышцы. Действительно, ингибирование p53, по-видимому, чрезвычайно полезно на ранних стадиях ишемии или во время последующего реперфузионного повреждения [4]. Белок p53 дикого типа с Arg72 более эффективен в индукции апоптоза, чем его Pro-вариант [5]. Некоторые исследования положительно связывают полиморфизм *Pro72Arg* в гене *TP53*, кодирующем белок P53, с диабетом [6] и ожирением [7], которые являются факторами риска развития ИБС. Однако роль полиморфизма данного гена в развитии ИБС ещё не доказана. Целью работы было проанализировать ассоциацию полиморфизма *Pro72Arg* гена *TP53* с риском развития ишемической болезни сердца.

ДНК была выделена из лейкоцитов цельной крови 90 пациентов с ишемической болезнью сердца и 56 здоровых индивидов. Аллель-специфическая ПЦР и ПЦР-ПДРФ были проведены для определения генотипа исследуемых лиц по полиморфизму *Pro72Arg*.

Среди здоровых и больных лиц частоты генотипов по исследуемому полиморфизму соответствуют равновесию Харди-Вайнберга. Частота аллеля *Arg72* в контрольной группе (0,750) несколько выше, чем в группе больных (0,700). Однако данные различия статистически не значимы. Разница в частоте генотипов между контрольной группой и группой больных также не является статистически значимой ($p=0,6$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Mathers C.D., Loncar D. // PLoS Med. 2006. № 3 (11). P. 2011–2030. Doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442
2. Cardiovascular Disability: Updating the Social Security Listings. Washington (DC): National Academies Press (US), 2010. 304 p.
3. Vousden K.H., Prives C. // Cell. 2009. Vol. 137 (3). P. 413–431. Doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037 2009.
4. Wei C.L., Wu Q., Vega V.B. et al. // Cell. 2006. Vol. 124 (1). P. 207–219.
5. Dumont P., Leu J.I., Della Pietra A.C. et al. 2003. // Nature genetics. 2003. Vol. 33 (3). P. 357–365.
6. Gaulton K.J., Willer C.J., Li Y. et al. Diabetes. 2008. Vol. 57 (11). P. 3136–3144. Doi: 10.2337/db07-1731.
7. Parry D.J., Grant P.G., Scott D.J.A. // Journal of vascular surgery. 2004. Vol. 40.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА 5-HTTLPR НА НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПАРАДИГМЕ СТОП-СИГНАЛ У ЛЮДЕЙ, ЖИВУЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ СОЦИО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ СИБИРИ

*Т.Н. Астахова¹, С.С. Таможников², А.А. Выскребцов¹, А.А. Карнова⁴, Н.В. Борисова⁴,
Д.В. Базовкина³, А.Н. Савостьянов^{1,2,3}*

¹Новосибирский государственный университет, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

²Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

³Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

⁴Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, 677000, Российская Федерация, г. Якутск, ул. Белинского, 58

Email: tastahova95@yandex.ru; s.tam@physiol.ru; a.vyskrebtssov@g.nsu.ru; karpova74@list.ru; borinat@yandex.ru; daryabazovkina@gmail.com; alexander.savostyanov@gmail.com

Аллельный полиморфизм транспортера серотонина 5-HTTLPR вызывает большой интерес у исследователей, так как существуют выявленные ассоциации различных аллелей этого полиморфизма с риском развития различных форм аффективной патологии (депрессия, тревожное расстройство, аддикция, повышенный риск суицида и т.д.) [1, 2]. В то же время такие ассоциации часто оказываются неоднозначными для разных человеческих популяций или подгрупп внутри одной популяции [3]. Например, аллель S- этого полиморфизма связан с повышенным риском депрессивных расстройств для европеоидных популяций, но с пониженным риском для тех же заболеваний в монголоидных популяциях [4, 5]. Отмечены взаимосвязи поведенческих эффектов 5-HTTLPR с климатическими условиями проживания людей [6]. Также отмечается влияние социокультурных факторов, таких как особенности личностного самоопределения, на взаимосвязь этого аллельного полиморфизма с риском психических заболеваний. Таким образом, ассоциации 5-HTTLPR с поведением здоровых людей и риском появления патологии находятся под сложным, комплексным воздействием широкого ряда факторов, непосредственно не относящихся к области генетики.

Целью нашей работы было изучить роль полиморфизма 5-HTTLPR в формировании электрофизиологической динамики мозговой активности, связанной с моторным контролем, в группах людей, относящихся к разным этносам и живущих в разных социо-климатических условиях. Нами обследованы группы русских, постоянно проживающих в г. Новосибирске (185 человек), якутов, постоянно проживающих в г. Якутске и трудовых мигрантов, переехавших на работу в г. Якутск преимущественно из стран Средней Азии (50 человек). У всех испытуемых взяты пробы буккального эпителия или плазмы крови для определения индивидуальных генотипов полиморфизма 5-HTTLPR. Многоканальная ЭЭГ использована для отслеживания частотно-временной динамики мозговой активности при выполнении испытуемыми экспериментальных заданий. Связанные с событием спектральные пертурбации (ERSP) использовались в качестве количественной меры изменений мозговой активности, индуцированной выполнением заданий. В качестве экспериментального метода нами выбрана парадигма Стоп-сигнал [7, 8], которая позволяет оценивать состояние головного мозга человека в двух различных состояниях: 1) при выполнении быстрых, целенаправленных движений; 2) при подавлении уже начатых движений, ставших неадекватными внешним условиям.

Совместный анализ поведенческих (скорость и точность реакции), мозговых (амплитуда десинхронизации альфа-ритма) и генетических данных без учета региона проживания и этнической принадлежности выявил, что генотип SS полиморфизма 5-HTTLPR ассоциирован с более эффективной организацией моторного контроля в сравнении с генотипами LL и LS, что проявляется как на поведенческом, так и на нейрофизиологическом уровнях. Однако, тот же генотип SS ассоциирован с более высокими показателями уровня тревожности у всех испытуемых, вне зависимости от этнической принадлежности и региона проживания. Сравнительный анализ показателей моторного контроля среди этнических групп без учета генотипа показал, что якуты в среднем характеризуются лучшими показателями моторного контроля в сравнении с другими группами. Совместный анализ средовых и генетических факторов выявил, что люди с генотипом SS демонстрируют лучшие показатели моторного контроля в стрессогенных внешних условиях (субэкстремальный климат, условия миграции), тогда как люди с генотипом LL, наоборот, более адаптированы к стабильным внешним условиям, не связанным с климатическим стрессом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lesch K. P., Bengel D., Heils A. et al. // Science. 1996. Vol. 274 (5292). P. 1527–1531.
2. Greenberg B.D., Li Q., Lucas F.R. et al. // American journal of medical genetics. 2000. Vol. 96 (2). P. 202–216.
3. Schinka J.A., Busch R.M. and Robichaux Keen, N. // Mol. Psychiatry. 2004. Vol. 9, № 2, P. 197–202.
4. Bousman C.A., Sarris J., Won E.S. et al. // J Clin Psychopharmacol. 2014. Vol. 34 (5). P. 645–648.
5. Savostyanov A.N., Naumenko V.S., Sinyakova N.A. et al. // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2015. Vol. 5 (6). P. 656–665.
6. Savostyanov A.N., Tamozhnikov S.S., Karpova A.G. et al. // Proc. 11th Int. Multiconf. Bioinf. of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB). Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2018. P. 78–80.
7. Band G.P., van der Molen M.W., Logan G.D. // Acta Psychol (Amst). 2003. Vol. 112 (2). P. 105–142.
8. Savostyanov A.N., Tsai A.C., Liou M. et al. // Neurosci Lett. 2009. Vol. 449 (2). P. 112–116.

Исследование поддержано грантами РФФИ № 18-29-13027и № 18-415-140021. Работа Т.Н. Астаховой выполнена в рамках проекта № 28.12487.2018/12.1 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМА *Gln192Arg* ГЕНА *PON1* С НАРУШЕНИЕМ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

Ю.С. Белицкая, Е.В. Машкина

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: shkarinova.yulya@yandex.ru*

Сперматогенез является очень сложным биологическим процессом, который регулируется каскадом активации и деактивации определённых генов, запускающих процессы пролиферации и дифференцировки клеток. К факторам, контролирующим уровень транскрипции генов, относятся и активные формы кислорода (АФК). В сперматогенезе АФК в физиологических концентрациях играют роль регуляторов функций сперматозоидов и активаторов акросомальной реакции. Но повышенное содержание АФК нарушает нормальное функционирование сперматозоида, воздействуя на органические соединения, такие как: белки, углеводы, жиры и нуклеиновые кислоты. Главной мишенью для свободных радикалов кислорода являются полиненасыщенные жирные кислоты. Окислительный стресс, причиной которого является аномальное накопление АФК, относится к одним из наиболее важных патогенетических механизмов нарушения мужской фертильности.

Повышенная концентрация активных форм кислорода может быть обусловлена нарушением работы антиоксидантной системы. Фермент параоксоназа 1 играет важную роль в защите организма от окислительного стресса, участвуя в липидном обмене и защищая липопротеины низкой плотности (ЛПНП) от окисления. Также данный фермент участвует в детоксикации орнанофосфатов. Для гена *PON1*, локализованного на длинном плече хромосомы 7, известен полиморфизм, приводящий к замене в 192-м положении белка глутатиона на аргинин. По результатам исследований, показано, что вариант белка *Gln192* значимо эффективнее в защите ЛПНП от окисления, чем мутантный вариант *Arg192*. Сперматозоиды человека чувствительны к АФК-индуцированному перекисному окислению липидов вследствие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот, при усилении выработки АФК происходит нарушение процессов формирования сперматозоидов, а также снижение их подвижности. В связи с этим целью работы было исследовать частоту встречаемости аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* у пациентов с патологией сперматогенеза и здоровых мужчин.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эякулята 82 мужчин, разделённых на две группы в зависимости от показателей спермограммы. Контрольную группу составили 46 мужчин, 36 человек – с олигозооспермией. Данная патология характеризуется снижением

концентрации сперматозоидов ниже нормативных значений. Согласно нормам ВОЗ от 2010 г., концентрация сперматозоидов при олигозооспермии составляет менее $20 \cdot 10^6/\text{мл}$. Полиморфизм *Gln192Arg* гена *PON1* исследовали с использованием набора реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия).

Распределение частот генотипов по исследуемому полиморфизму в контрольной группе и в группе с олигозооспермией соответствует равновесию Харди–Вайнберга ($X^2 = 0,01$ и $X^2 = 2,25$, соответственно). В контрольной группе преобладают гомозиготы по аллели *Gln192*, на их долю приходится 56,5 %, гетерозиготы составили 37 %, гомозиготы по аллели *192Arg* составили 6,5 %. В группе мужчин с олигозооспермией выявлено повышение доли гетерозигот (55,6 %) при одновременном снижении частоты регистрации гомозигот по аллели *Gln192*. Однако разница в распределении частот генотипов между двумя группами статистически не значима ($p = 0,26$). Таким образом, в проведенном исследовании не было выявлено наличия ассоциации полиморфизма *Gln192Arg* гена *PON1* с нарушениями сперматогенеза, в частности с олигозооспермией.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА СТИМУЛЫ В ПАРАДИГМЕ «ODD-BALL» И ПРИ РАСПОЗНАВАНИИ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ ПИСЬМЕННОЙ РЕЧИ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ 5-HTTLPR У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С СДВГ

А.А. Белоногов

*Новосибирский государственный университет, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск,
ул. Пирогова, 1*

E-mail: a.belonogov@g.nsu.ru

В последние десятилетия медиками и психологами отмечается увеличение числа поведенческих и неврологических расстройств, связанных с проблемами адаптации младших школьников к высокой учебной нагрузке. Чаще всего встречаются такие расстройства, как дефицит внимания, детская гиперактивность, повышенная тревожность, эмоциональные депрессии, большая часть которых в той или иной мере связана с работой систем направленного внимания и регуляции целенаправленного поведения.

Синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) в настоящее время является одним из наиболее распространённых диагнозов в детском возрасте. По разным данным, его частота составляет от 15 до 43 % среди детей младшего школьного возраста. Многочисленные исследования нейрофизиологических причин СДВГ свидетельствуют о гетерогенности этого состояния, что требует дифференциальной диагностики на основе сопоставления показателей разных форм произвольного и непроизвольного внимания.

Основными проявлениями синдрома являются повышенная неструктурированная активность, а также нарушения концентрации внимания в виде трудностей его удержания, снижения избирательности и выраженных частых переключений внимания. В большей степени для СДВГ характерна исполнительная дисфункция, связанная с нарушением избирательного внимания и принятия решения. Это наблюдается для всех подтипов СДВГ, в максимальной степени страдают контролирующие функции внимания.

Для постановки адекватного диагноза необходимо использовать комплексный подход, включающий нейрофизиологические методы исследования (например, метод ЭЭГ) и нейропсихологическое обследование. Использование такого подхода позволит выявить качественные, содержательные характеристики дефицитарности психических функций ребенка, природу имеющихся нарушений, а не просто констатировать наличие низких показателей внимания и повышенную импульсивность.

Объект – поведенческие реакции школьников в условиях выполнения тестов на внимание и распознавание эмоциональной письменной речи.

Предмет – нейрональные механизмы регуляции поведения, генетические факторы.

Цель – выявление роли генетического полиморфизма транспортера серотонина (5-HTTLPR) в развитии способностей к концентрации внимания и распознавания эмоциональной письменной речи у младших школьников.

В эксперименте приняли участие две группы детей: 18 детей с предположительным диагнозом синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) и 21 ребенок без неврологических патологий. У всех детей были взяты пробы буккального эпителия для определения полиморфизма 5-HTTLPR. *La*-, *Lg*- и *S*-аллели полиморфизма 5-HTTLPR были определены на образцах ДНК с использованием полимеразной цепной реакции с праймерами: 50-ggcgttgccgctctgaattgc-30 и 50-gagggactg agctggacaasssac-30. Полиморфизм 5-HTTLPR был идентифицирован с использованием электрофореза на агарозном геле. Размеры *S*- и *L*-аллелей для 5-HTTLPR были, соответственно, 489bp и 529bp. Для определения *La/Lg*-полиморфизма, продукты амплификации были расщеплены для 3h с *MspI* эндонуклеазой. Размеры продуктов расщепления *La*-аллеля были 340, 127 и 62bp, а для *Lg*-аллеля – 174, 166, 127 и 62bp.

Эксперимент проводился с двумя типами заданий в парадигме «odd-ball»: политональным (целевой сигнал – звук «мяу», нецелевой – звук «ква») и монотональным (целевой и нецелевой сигналы являются простыми звуками, различными по высоте). Испытуемый должен был игнорировать нецелевой стимул и нажимать на кнопку при целевом стимуле. Всего испытуемому в каждом из заданий подавалось 250 звуковых сигналов, 80 % которых являлись нецелевыми и 20 % – целевыми. Эксперимент также включал лингвистическое задание, предполагающее отнесение предложения к возможной грамматической ошибкой к одной из категорий: «мой–позитивные», «мой–негативные», «чужие–позитивные» и «чужие–негативные» (всего 40 предложений).

Для каждого испытуемого для заданий типа «odd-ball» был вычислен процент некорректных нажатий для нецелевых стимулов, процент пропущенных нажатий для целевых стимулов и среднее время реакции на целевой стимул. Для лингвистического задания был вычислен процент правильности нахождения грамматической ошибки и среднее время для каждой из категорий предложений.

В ходе исследования получены следующие результаты. Способность распознавать простые тона влияет на распознавание эмотивности речи, а чем дольше испытуемый распознавал тон, тем хуже он справлялся с отнесением предложений к разным категориям ($F(1; 31) = 6,79; p = 0,014$). Испытуемые, быстро реагирующие на целевой стимул из монотонального задания, верно распознают 95 % предложений без грамматических ошибок и 77 % предложений, в которых допущены ошибки; для испытуемых с медленной реакцией на целевой стимул уровень распознавания предложений, как с ошибками, так и корректных, составляет 85 % ($F(1; 33) = 16,11; p = 0,0001$). Наибольшая разница между группами проявляется в распознавании сложных тонов: здоровые дети допускают 0,5 % ошибок, тогда как дети с СДВГ – 2,3 % ошибок ($F(1; 32) = 3,97; p = 0,55$).

Одним из ключевых результатов данного исследования является выявление статистической связи показателей внимания в тесте «odd-ball» с распознаванием письменной эмоциональной речи.

Достоверные эффекты полиморфизма 5-HTTLPR были выявлены для показателей спектральных пертурбаций (ERSP), определяемых при помощи анализа ЭЭГ. В частности, был выявлен достоверный главный эффект полиморфизма на ERSP оценки ($F = 5,8, df = 1, p = 0,018$). Носители *LL*-генотипа имели достоверно большее увеличение спектральной мощности в частотном диапазоне от 7 до 17 Гц в течение 600 мс после предъявления сигнала стоп. Кроме того, было обнаружено достоверное взаимодействие полиморфизма серотонинового транспортера, временного диапазона и корковой области ($F = 2,43, df = 4,2, p = 0,045$). В первые 200 мс после предъявления сигнала Стоп ERSP оценки были больше в группе с *LL*-генотипом в париетальных ($F = 4,43, df = 2, p = 0,015$) и затылочных областях коры ($F = 5,62, df = 2, p = 0,005$). Во временном интервале от 200 мс до 400 мс после предъявления сигнала Стоп ERSP оценки были больше в группе с *LL*-генотипом в затылочных областях коры ($F = 3,49, df = 2, p = 0,035$). Во временном интервале от 400 до 600 мс после предъявления сигнала Стоп ERSP оценки были больше в группе с *LL*-генотипом в височных ($F = 4,75, df = 2, p = 0,011$), париетальных ($F = 3,75, df = 2, p = 0,028$) и на грани достоверности в затылочных областях коры ($F = 3,05, df = 2, p = 0,052$). Также было достоверно взаимодействие полиморфизма серотонинового транспортера, частотного диапазона, латеральности и

корковой области ($F = 4,72$, $df = 3,38$, $p = 0,002$). ERSР оценки после предъявления сигнала стоп были больше в группе с LL-генотипом по сравнению с носителями S-аллеля в альфа-2 ($F = 4,15$, $df = 2$, $p = 0,019$) и бета-1-диапазонах ($F = 4,49$, $df = 2$, $p = 0,014$). Также, ERSР оценки после предъявления сигнала Стоп были больше в группе с генотипом LL по сравнению с генотипами LS и SS в альфа-2- и бета-1-диапазонах. В альфа-2-частотном диапазоне ERSР оценки после предъявления сигнала Стоп были больше в группе с LL-генотипом в височных ($F = 4,23$, $df = 2$, $p = 0,017$), париетальных ($F = 4,78$, $df = 2$, $p = 0,011$) и затылочных областях ($F = 3,89$, $df = 2$, $p = 0,024$). В бета-1-частотном диапазоне ERSР оценки после предъявления сигнала Стоп были больше в группе с LL-генотипом в фронтальных ($F = 4,1$, $df = 2$, $p = 0,02$), париетальных ($F = 3,7$, $df = 2$, $p = 0,029$) и затылочных областях ($F = 5$, $df = 2$, $p = 0,009$).

В целом, полученный результат может быть интерпретирован как свидетельство того, что SS-генотип ассоциирован с лучшими показателями моторного контроля в неэмоциональных заданиях, но с худшими оценками способности к распознаванию эмоциональной окраски речи в сравнении с генотипами LS и LL.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-29-13027. Участие в конференции поддержано из средств государственного задания № 28.12487.2018/12.1 Минобрнауки Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, А.Н. Савостьянов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЛЮМИНАЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ю.А. Веряскина¹, С.Е. Титов^{1,2}, В.В. Кометова³, В.В. Родионов³

¹*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2*

²*АО «Вектор Бест», 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Арбузова, 1/1*

³*Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, 117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Академика Опарина, 4
E-mail: juliaver@mcb.nsc.ru*

Рак молочной железы (РМЖ) является самой распространённой формой рака среди женщин во всем мире. В настоящее время персонализированная терапия РМЖ во многом зависит от морфологии опухоли, её размера, наличия метастазов в лимфатических узлах и экспрессии таких маркеров, как рецептор эстрогена (ER), рецептор прогестерона (PR) и рецептор HER2, а также индекса пролиферативной активности Ki-67. Порядка 20 % опухолей характеризуются различиями в показателях ER, PR и HER2 при повторном анализе. Полученные различия могут быть следствием как технических факторов, так и наличия клеточной неоднородности внутри опухоли. Кроме генетической гетерогенности, существует эпигенетическая гетерогенность, которая также вносит вклад в неоднородность опухолевого образования. МикроРНК (миРНК) – это класс модуляторов, участвующих в развитии онкологических заболеваний, которые могут оказаться важными предикторами риска и прогрессирования заболевания. Стоит отметить, что уровень экспрессии миРНК может не совпадать в исследованиях из-за различных технических факторов, включая различия в реактивах или типе анализа, протоколах отбора проб, типа фиксации и хранения образцов в случае нефиксированных образцов. Несовпадение исследований экспрессии миРНК также может быть связано с внутриопухолевой гетерогенностью, однако на данный момент существует мало данных о внутриопухолевом распределении уровней экспрессии миРНК. Целью данной работы является исследование внутриопухолевого распределения профилей

экспрессии миРНК при люминальном РМЖ. Исследование включало 33 случая люминального А или люминального В (Her2-) подтипов РМЖ. Относительные уровни экспрессии миРНК-20а; -21; -125b; -126; -200b; -181а; -205; -221; -222; -451а; -99а; -145; -200а; -214; -30а; -191 измерялись методом ОТ-ПЦР в реальном времени в четырёх различных пространственных точках внутри каждой опухоли (граница опухоли, центр опухоли, периферия 1 и периферия 2 опухоли), а также в прилегающей морфологически неизменной ткани молочной железы. Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК между нормальной тканью молочной железы и различными внутриопухолевыми участками показал, что только четыре миРНК: миРНК-21, миРНК-200b, миРНК-200а и миРНК-191 являются общими дифференциальными маркерами при сравнении образцов, взятых из различных участков опухоли в сравнении с нормальной тканью. Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК между нормальной тканью молочной железы и границей опухоли выявил статистически значимые различия для десяти миРНК (-21; -126; -200b; -221; -222; -99а; -145; -200а; -30а; -191); десять миРНК (-21; -125b; -200b; -181а; -205; -99а; -145; -200а; -30а; -191) показали значимые различия уровней экспрессии при сравнении образцов нормальной ткани молочной железы и образцов, полученных из центральной части опухолевого образования; девять миРНК (-21; -125b; -200b; -181а; -451а; -99а; -200а; -30а; -191) показали значимые различия уровней экспрессии при сравнении образцов нормальной ткани молочной железы и образцов, взятых с периферии 1; тринадцать миРНК (миРНК-20а; -21; -125b; -126; -200b; -181а; -205; -221; -222; -145; -200а; -214; -191) показали значимые различия уровней экспрессии при сравнении образцов нормальной ткани молочной железы и образцов, взятых с периферии 2. Таким образом, мы делаем вывод, что уровни экспрессии миРНК подвержены значительным вариациям в зависимости от области опухоли люминального РМЖ, из которой взят образец на исследование. Этот факт может объяснить несогласованность данных об уровнях экспрессии миРНК, полученных из разных лабораторий.

ПОИСК SNP-МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМУ ГОНАРТРОЗУ СРЕДИ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ВОСПАЛЕНИЯ

*В.В. Внуков¹, И.В. Кролевец², С.Б. Панина¹, А.А. Ананян¹, А.А. Плотников¹,
М.А. Забродин³, Н.П. Милютин¹*

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

³Травмпункт МБУЗ «Горбольницы № 1 им. Н.А. Семашко», 344010, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, Ворошиловский пр., 105

E-mail: natmilut@rambler.ru

Остеоартроз (ОА) является многофакторным заболеванием, при котором наряду со старением, важная роль отводится травматическому повреждению суставов и генетической предрасположенности. Гонартроз (ГА) – деформирующий остеоартроз коленного сустава, встречается у каждого пятого человека на Земле. Установлено, что у лиц трудоспособного возраста остеоартроз коленного сустава в 80 % является посттравматическим. Причем доля вторичного – посттравматического – ОА неуклонно возрастает, что связано с ростом числа лиц травмоопасных профессий (военнослужащие, шахтеры, спасатели МЧС и пожарные и др.), а также с популяризацией спорта и активного образа жизни. Это приводит к увеличению встречаемости посттравматического артроза у лиц молодого и среднего возраста, что может быть связано, в том числе, с генетической предрасположенностью [1].

Цель исследования – провести поиск полиморфных маркеров (SNP-маркеров) предрасположенности к развитию посттравматического гонартроза (ПТГА) среди генов, регулирующих развитие окислительного стресса, и воспаления у пациентов с ПТГА русской популяции Ростовской области.

В группу для генотипирования SNP-локусов были включены 117 пациентов с ПТГА (46 мужчин/71 женщина; возраст $46,33 \pm 1,44$ лет; ИМТ $26,7 \pm 0,83$ кг/м²). В контрольную группу было включено 94 человека (возраст $44,01 \pm 1,55$ лет; 39 мужчин/55 женщин; ИМТ $25,41 \pm 0,58$ кг/м²) без признаков ПТГА в анамнезе, что было подтверждено рентгенологическим методом. Все обследованные пациенты имели русскую национальность и проживали на территории Ростовской области.

Среди исследованных генов локусами-маркерами повышенного риска развития посттравматического гонартроза, как показал генетический скрининг пациентов с ПТГА и здоровых людей, являются следующие полиморфные локусы: *A-82G MMP-12* и *G-84A NOS1* в общих выборках; *-16071G/2G MMP-1* у женщин. Так, аллель *-82G* в промоторе гена матричной металлопротеиназы-12 (*MMP-12*) ассоциирован с ПТГА, поскольку наличие данного аллеля увеличивает в 1,90 раза риск развития патологии в общей выборке: OR=1,90 (CI 1,11-3,25), $\chi^2=5,58$, $p=0,02$. Аллель *-82A* может иметь «протективное» значение. Показанная нами ассоциация генотипа *2G/2G* матричной металлопротеиназы-1 (*MMP1*) с риском развития ПТГА у женщин (OR=3,07 (CI 1,24-7,62), $\chi^2=7,38$, $p=0,03$) может быть связана с увеличением продукции MMP-1. Аллель *A* полиморфизма *-84G>A* гена нейрональной NO-синтазы (*nNOS*) встречается в группе пациентов с ПТГА в 2,02 раза чаще по сравнению со здоровыми людьми (OR=2,02 (CI 1,08-3,76), $\chi^2=7,41$, $p=0,02$).

В основе ОА лежит взаимодействие приобретённых факторов и наследственной предрасположенности, определяемой множеством генов. Однако отдельные рассматриваемые полиморфные замены не являются мутациями, с большой вероятностью повышающими риск развития артроза. Исходя из этого, особую значимость приобретают полногеномные поиски ассоциаций (GWAS) и анализы сцепления генов [2]. Метод редукции многофакторной размерности (MDR) был разработан для моделирования межгенных (эпистаз) и ген-средовых взаимодействий высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых параметрических методов, и является альтернативой другим методам, например, логистической регрессии. Адекватность MDR-модели оценивается двумя главными параметрами – контрольной взвешенной точностью и воспроизводимостью. Используя метод 10-кратной воспроизводимости (Cross-validation consistency, CVC), все данные разделяются на 10 групп, из которых 9 – опытных, 1 – контрольная. CVC – это количество раз выбора наилучшей модели из всего набора данных [3]. Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программ MDR v.3.0.2 и её модифицированной версии, позволяющей работать с неравными выборками «случай-контроль», – Generalized MDR, GMDR v.0.9. С помощью опций Exhaustive search (полный мультилокусный анализ) и Forced search (принудительный поиск) были получены следующие результаты. Наиболее значимыми среди всех возможных моделей оказались: двухлокусная модель *CAT C-262T × MMP-12 A-82G* (следует отметить, что оба эти гена локализованы на одной хромосоме - 11), трёхлокусная модель *CAT C-262T × MMP-12 A-82G × NOS1 G-84A*, четырёхлокусная модель *CAT C-262T × MMP-12 A-82G × NOS1 G-84A × IL1b T-31C*, пятилокусная модель *CAT C-262T × MMP-12 A-82G × NOS1 G-84A × IL1b T-31C × NOS3 T-786C*. Наибольшей достоверностью и воспроизводимостью среди возможных MDR- и GMDR-мультилокусных моделей для детерминации риска развития посттравматического гонартроза в исследованной популяции обладает пятилокусная модель *CAT C-262T × MMP-12 A-82G × NOS1 G-84A × IL1b T-31C × NOS3 T-786C*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ключевая роль в детерминации предрасположенности к посттравматическому гонартрозу принадлежит полиморфным локусам генов NO-синтаз (*NOS1*, *NOS3*), каталазы (*CAT*), матричной металлопротеиназы-12 (*MMP-12*) и интерлейкина-1β (*IL-1b*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Valdes A.M., Doherty S., Muir K.R. et al. // Ann. Rheum. Dis., 2013. Vol. 72. P. 1687–1690.
2. Prieto-Montana J.R., Riancho J.A. // Rev. esp. cir. ortop. traumatol. 2009. Vol. 53. P. 271–277.
3. Moore J.H. // Adv. Gen., 2010. Vol. 72. P. 101–116.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ (проект №6.6762.2017/БЧ).

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ микро-РНК-33А, -758, -96 ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Г.И. Волосовцова, Е.В. Бутенко

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: volaga@yandex.ru*

Исследования за последние три десятилетия выявили ключевые сигнальные и молекулярные регуляторные пути, участвующие в инициации и прогрессировании атеросклеротических бляшек. Выявление роли микро-РНК в качестве важных регуляторов патофизиологических процессов, таких как клеточная адгезия, пролиферация, поглощение и отток липидов с генерацией медиаторов воспаления, представило новое молекулярное понимание их влияния на эти процессы при атеросклерозе. Микро-РНК-33а, 758, 96, нацеленные на регуляцию метаболизма холестерина, а именно, липопротеинов высокой плотности, представляют особый интерес как важные факторы развития патологии и перспективные терапевтические мишени для ее лечения.

Исходя из этого, целью данного исследования явилось изучение ассоциации полиморфизма генов микро-РНК с развитием атеросклеротической патологии.

В исследовании приняли добровольное участие 112 жителей Ростовской области в возрасте от 60 до 83 лет, в равном процентном соотношении между мужчинами и женщинами. Средний возраст участников исследования составил 67 лет. По толщине поражения интимо-медиального слоя сонных артерий, как основному критерию оценки атеросклеротического поражения сосудов, а также клинических и биохимических симптомов атеросклеротического статуса, определённых кардиологом, выполнена градация добровольцев на три группы: контрольная, умеренный и выраженный атеросклероз. Геномная ДНК для молекулярно-генетических исследований была выделена из периферической крови с использованием набора QIAamp DNA Blood minikit (Qiagen, Germany). Исследование выполнено на базе центра коллективного пользования «Высокие технологии ЮФУ», клинический материал и инструментальные исследования выполнены на базе кардиологического центра Ростовской областной клинической больницы, медицинских центров НАО «Наука», АО «ВрачЪ». Аллель-специфические праймеры для генов *MIR758*, *MIR33a*, *MIR96* для выполнения ПЦР анализа были подобраны с помощью программы WASP Web-based Allele Specific Primer <http://bioinfo.biotech.or.th/WASP>. ПЦР анализ выполняли при помощи готовых реагентов «Евроген» России. Использовали готовую смесь qPCRmix-NS. Амплификацию проводили на приборе BIO-RAD CFX96 (США). Анализ равновесия Харди-Вайнберга и различия в распределении вариантов аллелей между группами пациентов и контроля оценивали с помощью критерия χ^2 . Для оценки риска развития атеросклероза мы использовали коэффициенты отношения шансов (OR).

В результате исследования установлено, что характер распределения частот полиморфизмов генов *MIR-758* (*rs1885068*), *MIR-96* (*rs13231740*), *MIR-33a* (*rs9620000*) в контрольной группе соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

Частота минорной аллели межгенного варианта g.129775479 С гена *MIR-96* (44 %), как и интронного варианта с.2907 + 201>С гена *MIR-33a* (8%) в контрольной группе добровольцев по

значению близка к таковой для европейской популяции (согласно базе данных проекта «1000 геномов» евро) и составляет 48 и 9 %, соответственно. Значительно ниже европейского уровня частота минорной аллели интронного варианта *n.2086-912T>G* гена *MIR758 (rs1885068)*, по значению (0,51) приближается к южно-азиатской популяции, где составляет 0,53.

При анализе частот генотипов и аллелей *g.129775479A>C* гена *MIR-96 (rs13231740)* в клетках крови пациентов с различным характером течения атеросклероза установлено, что гетерозиготный генотип для полиморфного гена *MIR-96 (rs13231740)* преобладает как в контрольной (40 %) группе добровольцев, так и среди пациентов. При увеличении степени выраженности патологии атеросклероза статистически значимо ($p=0,005$) увеличивается частота встречаемости гетерозиготного генотипа по полиморфизму *g.129775479A>C* гена *MIR-96* и составляет 59,7 и 62,8 % в группе с умеренно выраженным и выраженным атеросклерозом, соответственно. При анализе частоты встречаемости в клетках крови пациентов с умеренно выраженным атеросклерозом установлено, что носительство гетерозиготного генотипа *g.129775479AC* гена *MIR96* ассоциировано с повышенным риском ($OR = 2,53$, 95 % CI 1.09 – 5,85) развития патологии.

Ассоциации полиморфных вариантов генов *MIR-33a (rs 9620000)* и *MIR-758 (rs1885068)* с различными степенями атеросклероза выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют о выявленной ассоциации полиморфизма *g.129775479A>C* гена *MIR-96* с риском развития атеросклероза.

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА 5-HTTLPR НА ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ И ЭЭГ РЕАКЦИЙ В УСЛОВИЯХ РАСПОЗНАВАНИЯ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ ПИСЬМЕННОЙ РЕЧИ У ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ В УСЛОВИЯХ АДАПТАЦИИ К СУБАРКТИЧЕСКОМУ КЛИМАТУ

А.А. Выскребцов

Новосибирский государственный университет, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

E-mail: a.vyskrebtsov@g.nsu.ru

В настоящее время приобретает особую актуальность проблема адаптации человека к изменяющимся условиям жизнедеятельности. Жизнедеятельность в изменяющихся условиях осуществляется через универсальные процессы адаптации. Вопрос о характере и особенностях адаптации людей, проживающих в регионах экологического неблагополучия (РЭН), число которых в нашей стране значительно, вызывает затруднения у специалистов вследствие теоретической неразработанности проблемы и недостаточности её эмпирической базы. Между тем экологическое неблагополучие становится одним из лимитирующих факторов социально-экономического развития РЭН в силу негативного воздействия на здоровье и психику населения.

Эффективность деятельности, психологическое здоровье, сохранение ресурсов психики человека в экологически неблагополучной среде являются результатом успешной адаптации, что определяет необходимость изучения её закономерностей, специфики и обуславливает социальную и научную актуальность настоящего исследования. Одним из аспектов изучения адаптации является взаимосвязь генетических, социокультурных и климатических факторов, определяющих успешность приспособления человека к новой среде жизни.

Генетический полиморфизм транспортера серотонина 5-HTTLPR является маркером склонности к ряду психических заболеваний, связанных с регуляцией эмоций [1]. В условиях больших городов генотип *SS* данного полиморфизма ассоциирован с повышенным риском развития депрессии,

тревожно-депрессивных расстройств, алкоголизма и суицида. Однако имеются также данные [2], что люди с этим генотипом характеризуются повышенной устойчивостью к тем же заболеваниям в сравнении с носителями генотипов *LL* и *LS*, если они постоянно живут в климато-социальных условиях, характерных для регионов с низкой плотностью населения. Поведенческие и нейрофизиологические эффекты 5-HTTLPR в существенной степени медируются социокультурными факторами. Однако до сих пор остается неясным, как сказывается влияние этого полиморфизма на психофизиологическое состояние человека в условиях смены климата и социальных условий.

Цель – исследовать влияние генетического полиморфизма 5-HTTLPR на индивидуальные особенности восприятия эмоциональной окраски письменной речи у людей, находящихся в процессе адаптации к субэкстремальным климатическим и социальным условиям.

Объект – поведенческие реакции трудовых мигрантов в условиях распознавания письменной речи.

Предмет – нейрональные механизмы адаптации человека к субэкстремальным условиям жизни и генетические факторы, определяющие процесс адаптации.

Для исследования адаптационных механизмов была отобрана группа из 50 трудовых мигрантов, проживающих в г. Якутск. Среди мигрантов было 25 таджиков (из Таджикистана, Афганистана и Пакистана), 12 узбеков, 4 киргиза, 7 арабов (из Египта и Йемена), 1 перуанец, 1 замбиец. Мигранты были обследованы дважды. Первый визит состоялся в ноябре 2018 г. (т.е. сразу же после их переезда в Якутию), следующий визит состоялся в апреле 2019 г. (через полгода после переезда). В качестве контроля рассматривалась группа из 85 человек якутской национальности, постоянно проживающая в Якутии. Группы были выровнены по полу, возрасту и уровню образования.

В качестве экспериментального метода тестирования психофизиологического состояния испытуемого использовалось языковое задание. Испытуемому предлагалось прочитать 200 предложений на русском языке, часть которых имела эмоциональную окраску. Испытуемому сообщалось, что необходимо прочитать предложение и решить правильно ли грамматически составлено предложение. Если испытуемый считал, что оно верно, он должен был нажать на кнопку “1”, а если в нём допущена ошибка, то “2”.

Все 200 предложений были разделены на пять групп: 1) объективные (в которых не было эмоциональной окраски); 2) моя тревога – содержащие информацию о тревожности самого испытуемого; 3) чужая тревога – содержащие информацию о тревоге какого-либо лица, не являющегося испытуемым; 4) моя агрессия – содержащие информацию об агрессии самого испытуемого; 5) чужая агрессия – содержащие информацию об агрессии какого-либо лица, не являющегося испытуемым.

У всех испытуемых были взяты пробы буккального эпителия для определения индивидуального генотипа по полиморфизму 5-HTTLPR. Каждый испытуемый относился к одной из трёх групп: генотипы *LL*, *LS* или *SS*. ЭЭГ регистрировалось одновременно с выполнением задачи при помощи 128-канального усилителя фирмы Brain Products, Германия. Связанные с событиями спектральные пертурбации (ERSP) использовались в качестве меры индуцированной задачей мозговой активности.

Сопоставление поведенческих и ЭЭГ показателей в группах мигрантов и якутов выявило повышенную эмоциональную реактивность мигрантов на нейтральные стимулы, что коррелировало с их уровнем стресса и склонностью к депрессии. Иными словами, реагирование на эмоциональную информацию у мигрантов принципиально не отличается от того, что наблюдается у постоянных жителей региона, тогда как повышенное эмоциональное реагирование на формально нейтральные сообщения у мигрантов отражает их повышенный уровень стресса. Повторное обследование через полгода после первого показало, что уровень стресса и предрасположенность к депрессии у мигрантов достоверно снизились, что коррелировало со скоростью и успешностью решения лингвистических заданий. Генотип *SS* полиморфизма 5-HTTLPR был ассоциирован с большей скоростью адаптации в сравнении с генотипами *LL* и *LS*. Большинство мигрантов по результатам психологических опросников (методики Холмса, Бэка и Ахенбаха) показали снижение уровня стресса и риска развития тревожно-депрессивных расстройств в период второго обследования в сравнении с первым обследованием. У людей с генотипом *SS* снижение большинства показателей, отражающих уровень стресса и риска патологии, было достоверно сильнее, чем у людей с генотипами *LL* и *LS*.

Проведенное нами исследование показывает, что лингвистическая методика позволяет выявлять динамику мозговых процессов, связанную с адаптацией к приполярному климату. Гипотетически генотип *SS* полиморфизма 5-HTTLPR связан с лучшей способностью адаптации к субэкстремальным условиям жизни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lesch K. P., Bengel D., Heils A. et al. // Science. 1996. Vol. 274 (5292). P. 1527–1531.
2. Savostyanov A.N., Naumenko V.S., Sinyakova N.A. et al. // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2015. Vol. 5(6). P. 656–665.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №18-415-140021. Участие в конференции поддержано из средств государственного задания № 28.12487.2018/12.1 Минобрнауки Российской Федерации.

Научный руководитель – канд. биологических наук, доктор философских наук, профессор НГУ А.Н. Савостьянов

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *ATP8A1* У МУЖЧИН С ПАТОСПЕРМИЕЙ

О.М. Глумова, Е.В. Машина

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: olgatih87@gmail.com*

Бесплодие затрагивает примерно 15 % супружеских пар. На долю «мужского фактора» приходится 50 % всех случаев. Это такие нарушения как снижение количественных и/или качественных показателей эякулята, а также нарушение морфологии (тератозооспермия) и подвижности (астенозооспермия) гамет. Около 1/3 случаев мужского бесплодия относят к так называемому идиопатическому, или бесплодию неясного генеза, большинство случаев которого может быть обусловлено генетическими факторами, в том числе мутациями в ответственных за сперматогенез генах. Несмотря на принципиальную значимость генетических факторов для репродукции, чаще всего они остаются не диагностированными. Особенно это касается генных мутаций и микроструктурных перестроек хромосом в связи с недостаточно широким использованием молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов исследования в практической медицине.

Ген *ATP8A1* экспрессируется в большинстве тканей, включая семенники. Установлено, что он кодирует белок, называемый флиппазой, который служит для транспорта фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина на внешнюю сторону липидного слоя различных мембран. Такой перенос фосфолипидов требует энергии и проходит с потреблением АТФ. Точный механизм, с помощью которого флиппазы распознают и транспортируют липиды, остаётся неизвестным. Поддержание асимметричного фосфолипидного бислоя необходимо для нормального функционирования клетки. Например, появление анионного фосфатидилсерина на наружном слое мембраны служит для фагоцитарных клеток организма индикатором апоптотных клеток. И, наоборот, при недостаточном количестве фосфатидилсерина фагоциты не распознают погибшие клетки, и это может привести к их накоплению, что в дальнейшем может повлиять на качество спермы и результат оплодотворения. Известные однонуклеотидные замены в гене *ATP8A1* приводят к нарушению функционирования флиппазы, что влечет за собой изменения в распределении фосфолипидов в мембранном бислое.

Целью данной работы было исследовать частоту регистрации полиморфизма *A216G* гена *ATP8A1* в клетках эякулята мужчин с различными показателями спермограммы.

В работе было использовано 58 образцов ДНК, выделенных из эякулята мужчин, проживающих в Ростове-на-Дону. Из них 13 образцов с показателями спермограммы, соответствующими нормоспермии, 15 – астенотератозооспермии, 13 – тератозооспермии, 10 – олигоастенотератозооспермии и 7 образцов иных патологий спермы. Распределение частот генотипов по исследуемому полиморфизму соответствует равновесию Харди-Вайнберга, как в контрольной группе, так и в группе образцов ДНК с патоспермией. Преобладающим генотипом является гомозиготность по аллели А216 гена *ATP8A1* – его частота составила 53,8 % в контроле и 62,2 % – в среднем среди мужчин с патоспермией. Анализ частоты генотипов в зависимости от формы патоспермии показал, что наибольшее число гомозигот АА характерно для группы мужчин с тератозооспермией (76,9 %). В этой же группе наибольшая частота и гомозигот по аллели 216G гена *ATP8A1* – 15,4 %, тогда как в контроле данный генотип составляет 7,7 %. Однако из-за резкого снижения частоты гетерозигот по исследуемому полиморфизму (38,5 % в контроле и 7,7 % среди мужчин с тератозооспермией) частота аллели 216G составила всего 0,192, тогда как в контроле – 0,269. Данные различия в частотах генотипов и аллелей не являются статистически значимыми. Однако можно предположить, что увеличение частоты гомозигот по полиморфному варианту гена *ATP8A1* может отражаться в изменении количественных и качественных показателей процессов апоптоза у мужчин с тератозооспермией, что требует дальнейших исследований.

ГЕНЕТИКА ДОЛГОЛЕТИЯ

Л.А. Джанаридзе

*Санкт-Петербургский научный центр РАН, 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 5
E-mail: ljar@spbrc.nw.ru; ljar2005@yandex.ru*

*Главное не просто увеличить
продолжительность жизни, а продлить
здоровую и продуктивную жизнь.*

Расшифровка генома человека определила переход современной медицины, в том числе и медицины долголетия, на молекулярный уровень, основу которого составляет системная генетика.

Учитывая, что *старение* человека – результат сложных изменений функций генов, вызванных мутациями, нарушением процессинга белков, медленным угасанием транскрипционной активности, функциональной дегенерацией всего генома, дисфункцией и расстройством внутриклеточных взаимодействий, то и способы устранения таких нарушений, а также методы их предотвращения возможны, если напрямую, точно влиять на работу клеток. Для этого необходима в первую очередь идентификация генов старения, а далее прицельное воздействие на ДНК именно в области интересующего гена. Воздействие может быть разного характера: включение/выключение гена, внесение мутации и др. Для этого требуется уметь синтезировать белки, узнающие конкретную последовательность ДНК. Этот подход лечения старения – генная терапия, позволяющая доставлять в организм ген долголетия, либо вводить малые РНК, «выключающие» ген старения, по мнению большинства ученых, является наиболее приоритетным.

В оптимальных для жизнедеятельности условиях долголетие определяется скоростью старения. В свою очередь, феномен старения состоит из взаимосвязанных механизмов на различных биологических уровнях. Организменный уровень включает в себя неспособность поддерживать постоянство внутренней среды организма, функциональные расстройства и увеличение восприимчивости к возрастным заболеваниям, приводящим к смерти.

На тканевом уровне наблюдается хроническое воспаление, которое выступает драйвером многих возраст-зависимых заболеваний, прежде всего сердечно-сосудистых и нейродегенеративных.

На молекулярном уровне старение проявляется неспособностью клетки полностью восстановить повреждённые макромолекулы, при этом накапливаются повреждённые участки ДНК, генные и хромосомные мутации, укорачиваются теломеры.

Существует положительная взаимосвязь между продолжительностью жизни и эффективностью репарации повреждений ДНК. У человека по крайней мере 25 генов репарации двухцепочечных разрывов ДНК связаны с долгожительством у столетних.

Современные возможности редактирования генома позволяют направленно воздействовать на сайты метилирования генов, исправлять мутации генов митохондрий и генов старения.

Прогресс в генетике долголетия возможен при активации исследований по идентификации генов старения, регуляции активности генов биологических часов FOXO3a, Clotho, Clock, SIRT-1 (транскрипционный фактор, активация экспрессии генов), при полногеномном скрининге генов старения методом GWAS, направленной регуляции функции гипоталамуса (активация сиртуиновых генов и репрессия транспозонов L1, подавление амплификации транспозонов L1 ингибиторами RT), молекулярной и эпигенетической коррекции метаболических путей (ограничении калорийности питания, приеме геропротекторов, воздействии на микробиом).

Внедрение секвенирования нового поколения (NGS), сравнительный анализ баз данных ДНК долгожителей разных национальностей и разных этнических групп, разработка на основе этих данных персонализированной диеты, физической нагрузки, образа жизни – путь к медицине долголетия будущего.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КАНАЛА CFTR У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ В РОССИИ

А.С. Ефремова, Н.В. Булатенко, Т.Б. Бухарова, Н.В. Петрова, Н.Ю. Каширская, А.Ю. Воронкова, Ю.Л. Мельяновская, Е.И. Кондратьева, Р.А. Зинченко, Д.В. Гольдштейн

Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, 115522, Российская Федерация, г. Москва, ул. Москворечье, 1

Муковисцидоз (МВ) – это частое аутосомно-рецессивное наследственное заболевание с тяжелым течением, обусловленное нарушением работы мембранного белка-канала CFTR. Средний возраст больных МВ в нашей стране составляет $12,1 \pm 9,4$ лет [1]. С 2012 г. для терапии МВ в некоторых странах используют таргетные препараты, которые непосредственно влияют на патогенез заболевания и существенно увеличивают продолжительность жизни больных, улучшая её качество. Потенциаторы (VX-770) восстанавливают проводимость белка CFTR, а корректоры (VX-809 или VX-661) способствуют правильному фолдингу и транспорту белка CFTR к апикальной мембране клеток. Эффективность таргетных препаратов варьирует в связи с аллельной гетерогенностью CFTR. К 2019 г. их назначают при 39 мутациях гена, хотя известно около 2000 генетических вариантов CFTR. При остальных мутациях таргетные препараты не применяют, поскольку пока не известно и не исследовано их влияние на течение болезни. Несколько лет назад в Нидерландах были разработаны метод получения кишечных органоидов и форсколиновый тест [2]. Кишечные органоиды представляют собой 3D-модель длительного культивирования *in vitro*. Принцип форсколинового теста очень прост – стимуляция клеток кишечника форсколином вызывает усиление проводимости канала CFTR. С помощью форсколинового теста на кишечных органоидах персонализировано исследуют эффективность таргетных препаратов, а результаты исследований могут стать основанием для назначения терапии больному.

В данном исследовании по стандартным протоколам из ректальных биоптатов больных МВ были получены культуры кишечных органоидов [2]. Для проведения форсколинового теста органоиды культивировали в течение 24 ч на 96-луночных планшетах. Затем проводили прижизненное окрашивание Calcein AM (0,84 мкМ; 1 ч) и обрабатывали форсколином (0,15 или 5 мкМ) в присутствии таргетных препаратов. Корректор VX-809 (5 мкМ) добавляли на стадии посева, потенциатор VX-770

(5 мкМ) – одновременно с форсколином. Через определённые интервалы времени (0, 20, 40, 60 и 90 мин) проводили съёмку с использованием флуоресцентного микроскопа Observer. D1 (Zeiss, Германия) для регистрации ответа органоидов на стимуляцию.

Результаты исследования персонализированной оценки влияния потенциатора VX-770 и корректора VX-809, каждого в отдельности и их комбинации, на функциональную активность канала CFTR у больных МВ с разными генотипами суммированы в таблице.

Таблица

Анализ ответа кишечных органоидов с разными генотипами CFTR на стимуляцию форсколином в присутствии таргетных препаратов

Генотип пациента	Класс мутаций	Влияние VX-770	Влияние VX-809	Влияние VX-770 + VX-809
F508del / F508del	II / II	+	+	++
E92K / E92K	не известно / не известно	--	++	+++
E92K / CFTRdel1-11	не известно / I	--	++	+++
E92K / 2143 delT	не известно / I	--	++	+++
E92K / F508del	не известно / II	--	+++	+++
E92K / L138ins	не известно / IV	--	++	+++
F508del / V1421E	II / не известно	++	--	++
CFTRdel2,3 / W227X	I / I	--	--	--
F508del / W361X	II / I	--	+	+

-- отсутствие влияния; +, ++ и +++ увеличение набухания органоидов на 30–49 %, 50–100 % и более, чем на 100 %, соответственно, по сравнению с действием одного только форсколина

Большинство указанных генотипов представляют собой сочетание мутаций CFTR разных классов. Самая неблагоприятная клиническая картина характерна для генотипов с сочетаниями мутаций I–III классов. Наличие хотя бы одной мутации IV–VI характеризуется более мягкой клинической картиной. В качестве контроля использовали культуру кишечных органоидов с генотипом F508del/F508del. Усиление набухания органоидов при совместном действии форсколина и корректора указывает на увеличение общего количества функционального CFTR. В том случае, если эффект оказывает только потенциатор, можно утверждать, что количество белка-канала CFTR не отличается от нормального, но мутации приводят к снижению его проводимости. В ходе проведённых исследований была показана эффективность потенциатора VX-770 для генотипа F508del/V1421E, корректора VX-809 – для генотипов, несущих мутацию E92K. Наиболее эффективным оказалось комбинированное применение потенциатора и корректора. В этом случае наблюдалось восстановление функции канала CFTR практически для всех изученных генотипов, за исключением CFTRdel2,3/W227X и F508del/W361X.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2017 год. / Под ред. А.Ю. Воронковой, Е.Л. Амелиной, Н.Ю. Каширской, Е.И. Кондратьевой, С.А. Красовского, М.А. Стариновой, Н.И. Капранова. М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2019.
2. Dekkers J.F., Berkens G., Kruisselbrink E. et al. // Sci. Transl. Med. 2016. Vol. 8 (344). P. 344–384.

ОБЩНОСТЬ АССОЦИАЦИЙ TNFB (rs2239704) И TNFRSF1B (rs652625) С РАЗВИТИЕМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЁГКИХ

И.Ж. Жалсанова, Е.Ю. Брагина, М.Б. Фрейдин, Н.П. Бабушкина, В.П. Пузырев

*¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики (НИИ медицинской генетики) Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, 634050, Российская Федерация, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Email: irina.zhalsanova@medgenetics.com*

Введение: TNF является плейотропным цитокином, который играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Белки суперсемейства TNF кодируются генами *TNFA* и *TNFB*, расположенными в хромосомном регионе 6p21.3. Ген *TNFA*, в свою очередь, способен вызывать различные иммунные ответы путём передачи сигналов через два типа мембраносвязанных рецепторов – TNFR1 (TNFRSF1A) и TNFR2 (TNFRSF1B).

Развитие многих широко распространённых заболеваний связано с дефектами в генах семейства TNF и TNF-рецепторов, влияющих на уровень воспалительных цитокинов. Особый интерес вызывает исследование их связи с развитием бронхиальной астмы (БА) и туберкулеза (ТБ), как иммунологически полярных заболеваний, которые редко одновременно развиваются у одного индивидуума. Есть основания полагать, что эти два заболевания являются «обратно» коморбидными, развитие одного из этих заболеваний, как правило, способствует исключению фенотипических проявлений другого. Исследование общности и специфичности ассоциаций кластера генов TNF и TNF-рецепторов с развитием БА и ТБ может быть важным для понимания механизмов «обратной» коморбидности между ними.

Целью исследования являлось изучение ассоциации полиморфных вариантов кластера генов *TNF* (*TNFA* и *TNFB*) и рецептора *TNFRSF1B* с развитием БА и ТБ.

В работе изучено 250 пациентов с диагнозом БА и 421 пациент с ТБ. Контрольная группа сформирована относительно здоровыми лицами соответствующего пола и возраста без атопической бронхиальной астмы и туберкулеза в анамнезе ($n=560$). Общими критериями включения в исследование для всех групп было отсутствие родственных связей между индивидуумами и этническая принадлежность к европеоидам. Генотипирование полиморфных вариантов генов *TNFA* (rs1800629), *TNFB* (rs2239704) и *TNFRSF1B* (rs652625, rs603151, rs525891) проведено при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ; ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов). Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса или двусторонний точный тест Фишера.

Полиморфные варианты кластера гена *TNF* (*TNFA*, *TNFB*) и его рецептора *TNFRSF1B* показали ассоциацию с развитием как БА, так и ТБ. В исследовании выявлена ассоциация аллеля С полиморфизма rs2239704 гена *TNFB* (*LTA*) с развитием БА и ТБ ($p=0,040$ и $p=0,006$, соответственно).

Выявлены значимые различия при сравнении частот аллелей по варианту rs652625 гена *TNFRSF1B*: частота минорного аллеля rs652625*А гена *TNFRSF1B* значительно различалась между больными и здоровыми (БА – 2,4 %, ТБ – 6,25 % и здоровые – 10,17 % ($p=7,68E-06$, $p=0,01$ для БА и ТБ, соответственно)). Ассоциации с вариантами rs2239704 гена *TNFB* (*LTA*) и rs652625 гена *TNFRSF1B* в контексте БА и ТБ изучены впервые.

Таким образом, полученные результаты показывают перекрывание между локусами подверженности БА и ТБ, в числе которых гены *TNFB* (rs2239704) и *TNFRSF1B* (rs652625), свидетельствуя, что в их развитие вовлечены общие молекулярные механизмы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН II.1» (№ 0550-2018-0003).

АНАЛИЗ ГЕНА ИНТЕРФЕРОН ИНДУЦИРОВАННОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА 5 (*IFITM5*) У БОЛЬНЫХ НЕЗАВЕРШЁННЫМ ОСТЕОГЕНЕЗОМ

А.Р. Зарипова¹, Р.И. Хусаинова^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, 450054, Российская Федерация, г. Уфа, пр. Октября, 71

Незавершённый остеогенез (НО) (несовершенный остеогенез, код по МКБ-10: Q78.0) – клинически и генетически гетерогенное наследственное заболевание соединительной ткани, также известное как «врождённая недостаточность», или «ломкость костей», или «болезнь Лобштейна–Вролика». К основным клиническим признакам НО относятся повышенная ломкость костей, голубые склеры, низкий рост, снижение слуха, деформация костей скелета и аномалии дентина. На сегодняшний день идентифицировано 20 генов (<https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>), ответственных за развитие НО, и продолжается поиск новых генов, вовлечённых в патогенез заболевания. В российской медицинской литературе мало информации о распространённости заболевания в целом и отдельных его форм, описан только один клинический случай пациента с НО типа V.

Целью данного исследования является поиск структурных изменений гена интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*), ответственного за развитие V типа НО, с последующей идентификацией выявленных изменений, определением патогенетической значимости и клинической характеристикой пациентов.

В нашей работе использованы образцы ДНК 99 больных незавершённым остеогенезом из 86 неродственных семей и 72 контрольных образца здоровых индивидов с нормальным уровнем МПКТ, соответствующих по возрасту, полу исследуемой выборке больных. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене *IFITM5* проводили методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP) по методике, предложенной Орита с соавторами, с щелочной и температурной денатурацией. Последовательности нуклеотидов у образцов с изменённой подвижностью однонитевой ДНК определяли с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500. Анализ патогенности ранее неописанных вариантов проводился с использованием компьютерного моделирования с применением предсказательных программ SIFT, Polyphen2, MutPred, MutationTaster, nsSNPAnalyzer, Human Splicing Finder.

У пациента 7 лет мужского пола башкирской этнической принадлежности обнаружена ранее описанная мутация с.-14C>T в промоторной области гена *IFITM5* в гетерозиготном состоянии, приводящая к появлению нового стартового кодона и добавления пяти аминокислот (Met-Ala-Leu-Glu-Pro) в N-конец белка. Клиническая картина заболевания полностью соответствовала V типу НО. Диагноз был поставлен в возрасте 2,5 лет. Первый перелом – в 1,5 года (левое бедро со смещением, упал с высоты собственного роста), всего – 10 переломов. Отмечается укорочение левой нижней конечности на 3 см, вальгусная деформация левого бедра за счёт гиперпластической костной мозоли. У родителей пробанда данная мутация не идентифицирована, они клинически здоровы, проведено установление биологического родства с использованием панели микросателлитных локусов, члены семьи являются родственниками первой степени родства, что свидетельствует о возникновении мутации *de novo* у пациента с НО.

Незавершённый остеогенез V типа (OMIM 610967) представляет собой нелетальную форму заболевания, которая характеризуется широкой вариацией тяжести клинических проявлений и аутосомно-доминантной моделью наследования. Мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* впервые была описана в 2012 г. и в последующем в нескольких исследованиях сообщалось о случаях выявления данной мутации у пациентов с фенотипом НО типа V.

Нами также идентифицированы три известных полиморфных варианта – rs57285449 (с.80G>C (p.Gly27Ala)) и rs2293745 (с.187-45C>T), rs755971385 (с.279G>A), два из которых встречались с высокой частотой у пациентов и в контрольной группе, а rs755971385 выявлен только у трёх неродственных пациентов с НО в гетерозиготном состоянии, в контрольной группе не обнаружен. Полиморфизм rs755971385 встречается в мире с частотой менее 0,01, выявлен в рамках проектов GnomAD (T=0,00003), TOPMED (T=0,00001), ExAC (T=0,00005), в нашем исследовании частота аллеля *A (T – с ведущей цепи ДНК) оказалась выше и составила 0,035. Замена является синонимичным вариантом в кодирующей последовательности гена *IFITM5*, не приводящим к замене аминокислоты в последовательности

белка (NP_001020466.1:p.Thr93=). Нами также у двух неродственных пациентов идентифицирован полиморфный вариант *c.128G>A* (*p.Ser43Asn*) в 1 экзоне гена *IFITM5*, ранее не описанный в литературе. Анализ данного изменения в предсказательных программах не выявил значимости данного варианта в нарушении функционирования гена.

Таким образом, нами выявлена мутация *c.-14C>T* в промоторной области гена *IFITM5* в гетерозиготном состоянии у пациента с V типом незавершённого остеогенеза, возникшая *de novo*, а также несколько непатогенных полиморфных варианта.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-015-00489_a.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ

В.В. Кущенко

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: kushenko@srfedu.ru*

Шизофрения представляет собой распространённое по всему земному шару психиатрическое заболевание, которым страдает до 1 % населения [1]. Специфичность симптомов делает данное расстройство актуальной и активно изучаемой патологией. С генетической же точки зрения шизофрения является полигенным состоянием, характеризующимся 50 %-ной конкордантностью монозиготных близнецов и совокупным вкладом огромного числа генных систем, эпигенетических профилей и полиморфных вариантов [2]. Несмотря на многолетние исследования для шизофрении не выявлены уникальные молекулярные процессы, приводящие к развитию заболевания. Существует множество моделей формирования шизофрении в ЦНС, и одной из самых перспективных является модель нейроразвития шизофрении, рассматривающая патологию как результат процесса аномального формирования и созревания головного мозга, а не в качестве нейродегенеративного синдрома. В рамках этой модели одним из факторов развития шизофрении считается феномен нейровоспаления, выраженный во влиянии иммунных клеток на нервные. Это влияние может привести к нарушению синаптической передачи, а также к созданию цитотоксичной среды для нервных клеток [3]. Генетические факторы нередко выступают регуляторами подобного воздействия, причём данный эффект широко варьируется в разных этнических группах [4].

Целью работы являлось определение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов -592C>A (rs1800872) и -819C>T (rs1800871) гена *IL10* с риском развития шизофрении.

Материалом для исследования послужила венозная кровь 100 мужчин и 100 женщин, страдающих шизофренией. Популяционный контроль составила группа из 52 здоровых мужчин и женщин. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови осуществляли с помощью реагента «ДНК-экспресс кровь» (Литех, Россия). Для анализа полиморфизмов использовали реагенты SNP-экспресс (Литех, Россия). Разделение продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Исследование полиморфизмов -592C>A (rs1800872) и -819C>T (rs1800871) гена *IL10* продемонстрировало отсутствие статистически значимых отличий по данным маркерам между группами лиц с шизофренией и общепопуляционным контролем. Обнаружено, что в группе больных индивидуумов по полиморфизму rs1800872 преобладает аллель С и генотип С/С, равно как по маркеру rs1800871 преобладает аллель С и генотип С/С. Согласно проекту 1000 Genomes, оба аллеля являются таковыми дикого типа (ensemble.org). Показано, что данные полиморфизмы способны влиять на экспрессию гена, что приводит к изменениям концентрации противовоспалительной молекулы интерлейкина-10. К примеру, аллель С полиморфизма rs1800872, который локализован на STAT-3-

связывающем участке гена *IL10*, связан с большей концентрацией данного цитокина, тогда как аллель А с меньшей. Отмечается, что в различных популяциях вышеописанные маркеры могут выступать рисковыми аллелями шизофрении [5].

Полученные данные не позволяют со значительной долей уверенности сделать вывод о перспективности маркеров -592С>А (rs1800872) и -819С>Т (rs1800871) гена *IL10* в сфере молекулярно-генетической диагностики шизофрении и заболеваний соответствующего спектра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Charlston F.J., Ferrari A.J., Santomauro D.F. et al. // Schizophrenia Bulletin. 2018. Vol. 44, № 6. P. 1195-1203. Doi: 10.1093/schbul/sby058;
2. Tang J., Fan Y., Li H. et al. // Journal of genetics and genomics. 2017. Vol. 44, № 6. P. 295–306. Doi: 10.1016/j.jgg.2017.05.005;
3. Heinz A., Murray G.K., Schlagenhauf F. et al. // Schizophrenia Bulletin. 2018. Doi: 10.1093/schbul/sby154
4. Na K.S., Jung H.Y., Kim Y.K. // Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 2014. Vol. 3, № 48. P. 277-286. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.10.022
5. Kapelski P., Skibinska M., Maciukiewicz M. et al. // Schizophrenia Research. 2015. Vol. 169, № 1–3. P 1–9. Doi: 10.1016/j.schres.2015.10.008

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ В ОПИСАНИИ КАРИОТИПИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

**Н.А. Лемская¹, С.А. Романенко¹, А.А. Дольский¹, Д.Ю. Прокопов¹,
А.Р. Шорина², Ю.В. Максимова³**

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8/2

²Городская клиническая больница № 1, Государственный Новосибирский областной консультативно-диагностический центр, 630047, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6/7

³Новосибирский государственный медицинский университет, 630075, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Залесского, 4
E-mail: lemnat@mcb.nsc.ru

В результате перестройки, произошедшей в гаметах одного из родителей, появляются пробанды, все клетки которых несут мутацию. В случае возникновения *de novo* наблюдается мозаицизм, при этом выраженность отклонения зависит от стадии эмбриогенеза, на которой возникла мутация. Дети – носители хромосомных aberrаций, которые рождаются и выживают, часто страдают от очень серьезных психических и/или физических патологий. Для родителей, в семьях которых появляются дети с аномалиями кариотипа, важно знать риски появления больных потомков в следующих беременностях. Часто носители сбалансированных перестроек не подозревают об их наличии и при этом имеют повышенный риск рождения детей с отклонениями в результате формирования гамет с перестройкой в ходе мейотической сегрегации.

Основным методом исследования кариотипа до сих пор остается GTG-окрашивание. Однако во многих случаях невозможно надежно идентифицировать происхождение дериватных элементов, установить границы разрывов хромосом. Для этих целей хорошо подходят методы молекулярной цитогенетики – такие, как прямой и реципрокный пэйнтинг, микродиссекция аномальных хромосом с последующим секвенированием.

С помощью молекулярно-цитогенетических подходов были проанализированы три редких клинических случая хромосомных aberrаций, унаследованные от родителей и возникшие *de novo*, установлены районы перестроек и границы разрывов. В двух семьях пробанды унаследовали дериватные хромосомы от носителей сбалансированной транслокации с участием хромосомы 9. В третьей семье

у пробанда в кариотипе присутствует малая сверхчисленная хромосома, которая сформировалась *de novo* из материала коротких плеч хромосомы 8. Полученные сведения помогают врачам генетикам верифицировать первичные диагнозы и прогнозировать вероятность рождения здоровых потомков.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 18-04-00826 А.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА *Ser326Cys* ГЕНА *hOGG1* ПРИ ПАТОСПЕРМИИ

***С.В. Ломтева¹, К.Ю. Сагамонова¹, Т.П. Шкурат², К.Г. Савикина¹, О.В. Лянгасова²,
М.В. Левченко¹, А.Н. Шестель¹, М.А. Максимова³, Г.А. Чурюмова³,
А.С. Зейнулабидова³***

¹Центр репродукции человека и ЭКО, Российская Федерация, 344060, г. Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, 90А

²Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

³ООО «Лабораторные технологии», Российская Федерация, Ростовская обл, Аксайский р-н, пос. Верхнетемерницкий, ул. Обсерваторная, 38

E-mail: embryolab61@gmail.com

Одной из основных причин нарушения функции сперматозоидов является окислительный стресс, который не только нарушает целостность ДНК сперматозоида, но и ограничивает потенциал оплодотворения этих клеток в результате побочного повреждения белков и липидов в плазматической мембране сперматозоидов. Важную роль в сохранении геномной целостности играют системы восстановления ДНК. Ген *hOGG1* кодирует фермент эксцизионной репарации оснований, удаляющий из ДНК остатки 8-оксогуанина, образующегося под действием активных форм кислорода (АФК). В последние годы среди многих полиморфизмов генов *hOGG1* наибольшее внимание получил полиморфизм *Ser326Cys*. [1].

Целью исследования являлось изучение частоты встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера *Ser326Cys* гена *hOGG1* при патоспермии в Ростовской области.

Нами были обследованы 150 соматически здоровых мужчин в возрасте от 23 до 48 лет, обратившихся в ООО «ЦЕНТР РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА И ЭКО», города Ростов-на-Дону с проблемой бесплодия в браке и патоспермией в анамнезе. Из этого числа были исключены пациенты азооспермией, генетическими заболеваниями, наличием воспалительных процессов различных этиологий, а также пациенты из пар с доказанным женским бесплодием. Контрольная группа включала доноров спермы. Все испытуемые проходили анкетирование и медицинский осмотр врачом-андрологом.

Генотипическая структура популяции по полиморфизму гена *hOGG1 Ser326Cys* у жителей Ростовской области 66 % *Ser/Ser*: 34 % *Ser/Cys*: 0 % *Cys/Cys*, подчиняется равновесию Харди-Вайнберга (табл.). Частота мутантного аллеля у жителей Ростовской области q=0,17. Частота мутантного аллеля в группе с олигозооспермией составила 0,313; структура генотипов – 50,0 % *Ser/Ser*: 37,5 % *Ser/Cys*: 12,5 % *Cys/Cys*. При астенозооспермии частота мутантного аллеля 0,128; структура генотипов представляет собой 76,9 % *Ser/Ser*: 20,5 % *Ser/Cys*: 2,6 % *Cys/Cys*.

Частоты генотипов и аллелей по полиморфным вариантам гена *hOGG1* в клетках эякулята (в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга)

Ген, генотип, аллель	Нормоспермия	Патология спермы			
		Астенозооспермия абс. (%)	χ^2_1 (P)	Олигозооспермия абс. (%)	χ^2_1 (P)
<i>hOGG1 Ser326Cys</i>					
<i>Ser/Ser</i>	33 (66,0)	30 (76,9)	3,07 (0,22)	20 (50,0)	7,29 (0,03)
<i>Ser/Cys</i>	17 (34,0)	8 (20,5)		15 (37,5)	
<i>Cys/Cys</i>	0	1 (2,6)		5 (12,5)	
Аллель <i>Cys</i>	0,17	0,128		0,313	
$\chi^2_2(P)$		0,59 (0,44)		5,05 (0,02)	
$\chi^2_3(P)$		Генотипы: 6,79 (0,03)		Аллели: 7,78 (0,005)	

Примечание: χ^2_1 – сравнение с контролем частот генотипов; χ^2_2 – сравнение с контролем частот аллелей; χ^2_3 – сравнение между группами астенозооспермии и олигозооспермии.

Таким образом, у мужчин с патоспермией, проживающих в Ростовской области, регистрируются гомозиготные генотипы по мутантному аллелю, в случае с олигоспермией их число составляет 12,5 %, при нормоспермии гомозиготы по изучаемому полиморфизму не зарегистрированы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith T.B. et al. // J. Cell Sci. 2013. С. jcs. 121657.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ИММУНОТЕРАПИИ ПСОРИАЗА

А.В. Мезенцев¹, Ю.А. Мозулевцева², С.А. Брускин¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3

²Российский государственный аграрный университет (МСХА им. К.А. Тимирязева), 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

E-mail: mesentsev@vigg.ru; tixonya95@yandex.ru; brouskin@vigg.ru

В настоящее время иммунотерапия является одним из наиболее эффективных методов лечения псориаза. Совершенствование методов лечения болезни позволило разработать терапевтические антитела, которые избирательно инактивируют цитокины, непосредственно связанные с патогенезом псориаза, и их специфические рецепторы. При этом доля больных, устойчивых к иммунотерапии, по разным оценкам, всё ещё может составлять ~10–15 %. Принимая во внимание стоимость и продолжительность курса лечения, было бы целесообразным разработать метод, который бы позволял использовать результаты ранней диагностики для оценки конечного результата. В отличие от традиционных диагностических процедур, первичные данные полногеномных исследований уже сейчас можно применять для выбора оптимальной стратегии лечения различных категорий больных, учитывая их индивидуальные генетические особенности.

Целью проведённого исследования было показать, каким образом результаты компьютерного анализа могли бы помочь в выборе больных, для которых иммунотерапия псориаза могла бы оказаться наиболее эффективной.

Используя первичные данные полногеномного исследования об экспрессии генов в поражённой и непораженной псориазом коже, мы провели сравнительный анализ образцов, полученных от 16 больных псориазом, перед проведением терапии и через неделю после её начала. Для лечения больных были использованы терапевтические антитела адалимумаб (внутривенно, 40 мг, каждую нечётную неделю, в течение 15 недель). По окончании терапии, т.е. через 16 недель после её начала, были также получены данные об изменениях индекса PASI.

Перед анализом первичных данных нами были отобраны пробы, которые характеризовали статистически достоверные изменения в экспрессии белок-кодирующих генов. После проведения лог-трансформации был получен массив данных с количественной оценкой изменений в поражённой коже каждого больного, по сравнению с непоражённой кожей, в указанных временных точках, т.е. до начала терапии и через одну неделю после начала курса. Используя метод главных компонент, мы установили различия между индивидуальными образцами, разделили образцы на две группы и охарактеризовали различия между ними.

Для образцов, представленных в группе 1, изменения PASI составили 80 % и выше. Для образцов, представленных в группе 2, изменения PASI составили менее 80 %. Сравнение группы 1 и группы 2 выявило 94 гена с наибольшими изменениями. Анализ взаимодействий между белками, которые они кодируют, выявил три подгруппы белков, относящиеся к комплексу эпидермальной дифференцировки (всего 15 белков), цитокератинам (KRT6C, KRT16 и KRT23) и четыре белка, активируемых цитокином CCL19 (CCL19, SSTR4, OPRM1 и NMUR1).

Разделив образцы в соотношении 2:1, мы показали возможность достоверной оценки изменений PASI при использовании следующих методов машинного обучения: регрессии лассо, ридж-регрессии и PLS. Помимо этого, используя регрессию лассо, мы выявили ковариацию между рядом анализируемых переменных. Это позволило сократить сигнатуру с 94 до 8 генов, а последующая проверка показала, что изменения и в их экспрессии можно также использовать с аналогичной целью, применяя уже упомянутые подходы.

Таким образом, нами было показано, что по изменениям в экспрессии восьми генов (*TDRD10*, *SSTR4*, *GLRX*, *CCND1*, *FLNC*, *CHM*, *HOPX*, *CCL19*) в образцах поражённой и непоражённой кожи, которые были получены до начала терапии и через одну неделю после начала курса, можно оценить, каким будет изменение PASI у конкретного больного по окончании курса лечения и сделать заключение о его устойчивости к иммунотерапии антителами адалимумаб.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ

И.Ю. Митрошина¹, Н.П. Сирота¹, В.Н. Прокофьев², Е.А. Кузнецова¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3

²Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: niib2@mail.ru

Поиск чувствительных и малоинвазивных биомаркеров, позволяющих выявить патологические состояния организма, в первую очередь – сердечно-сосудистые, инфекционные и онкологические заболевания, в настоящее время остаётся актуальным. Так, постоянно предпринимаются попытки поиска биомаркеров онкологических заболеваний с целью их раннего выявления и уменьшения смертности пациентов. В качестве такого биомаркера предлагалось использовать внеклеточную ДНК (вкДНК), которую можно сравнительно легко выделить из биологических жидкостей организма,

например, крови. Считается, что вкДНК – это фрагменты ядерного и митохондриального геномов, попадающие в кровотоки в результате разрушения клеток (апоптоз, некроз) или активной секреции ДНК во внеклеточное пространство. У здоровых людей концентрация циркулирующей вкДНК низкая, так как большинство нежизнеспособных клеток эффективно удаляются из кровообращения фагоцитами. У онкологических больных регистрировались повышенные уровни вкДНК, что, как правило, связывали с развитием опухоли. Однако повышение уровня вкДНК наблюдали и у перенёсших инфаркт миокарда, физическую травму, либо воспаление. Интересно, что для ряда заболеваний (диабет обоих типов, ишемическая болезнь сердца, ожирение, ряд онкологических заболеваний) наблюдался не только повышенный уровень вкДНК, но и увеличение уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови, определяемого методом «комета тест». Как соотносятся уровни повреждений ДНК ядродержащих клеток крови и концентрация вкДНК сыворотки/плазмы крови – не известно. Тем не менее такой показатель, как количество вкДНК, по-видимому, может быть дополнительной характеристикой патологического процесса в комбинации с другими опухолевыми маркерами.

Изучали изменение уровней внеклеточных суммарной и митохондриальной ДНК сыворотки крови здоровых доноров разного пола и возраста. Показано, что базовый уровень повреждений ДНК лейкоцитов крови и уровни ДНК сыворотки сильно варьируют у разных доноров. Концентрации внеклеточных ДНК в целом выше у мужчин, чем у женщин. Наблюдается тенденция к увеличению относительного количества копий митохондриальной ДНК, определяемого по ΔCt , у женщин по сравнению с мужчинами; у пожилых индивидов оно существенно варьирует для обоих полов, возможно вследствие возрастных физиологических изменений. Необходимо учитывать пол и возраст пациентов при использовании циркулирующих ДНК для диагностики и мониторинга.

Исследования выполнены в рамках базовой части государственного задания Министерства образования и науки НИР №1878 «Разработка фундаментальных аспектов молекулярной диагностики и митохондриальной фармакологии» и «Исследование функциональной роли генетических полиморфизмов и микро РНК в геноме человека и животных» в соответствии с Задачей №6.6762.2017/БЧ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *SLC26A4* У ПАЦИЕНТОВ С АНОМАЛИЯМИ ВНУТРЕННЕГО УША (EVA И MONDINI) В ЯКУТИИ

А.А. Никанорова^{1,2}, Л.А. Кларов^{1,2}, М.М. Попов³, Н.А. Барашков^{1,3}

¹*Лаборатория молекулярной генетики, Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, 677019, Российская Федерация, г. Якутск, Сергеляхское ш., 4*

²*Республиканская больница № 2 – Центр экстренной медицинской помощи, 677005, Российская Федерация, г. Якутск, ул. Петра Алексеева, 83а*

³*Научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии, Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, 677000, Российская Федерация, г. Якутск, Кулаковского, 46
E-mail: nikanorova.alena@mail.ru; eizonix@gmail.com, qwentus@bk.ru; barashkov2004@mail.ru*

Синдром Пендреда является наследственным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования, для которого характерны нейросенсорная глухота, сопровождающаяся нарушением работы щитовидной железы [1], и в половине семейных случаев этого заболевания выявляются мутации в гене *SLC26A4*. Ген локализован на седьмой хромосоме (7q22-q31), состоит из 21 экзона и кодирует трансмембранный транспортный белок пендрин (PDS) [2]. Белок пендрин является многофункциональным анионным обменником, который активно экспрессируется в тканях щитовидной железы, внутреннего уха и почек [3]. Показано, что мутации в гене *SLC26A4* могут приводить к формированию как синдрома Пендреда, так и к изолированной тугоухости, а также к

потере слуха, сочетанной с аномалиями внутреннего уха (Mondini и EVA) [1]. Целью настоящей работы является изучение молекулярной этиологии аномалий внутреннего уха (Mondini и EVA) у пациентов с нарушениями слуха в Якутии.

Была сформирована выборка, состоящая из 165 пациентов с нейросенсорной тугоухостью. Участники исследования прошли компьютерную томографию височных костей в Отделении лучевой диагностики Республиканской больницы №2-РЦЭМП (г. Якутск). На каждого пациента, включённого в исследование, была заполнена анкета, касающаяся вопросов здоровья, а также содержащая информацию о членах родословной преимущественно до четвёртого поколения. Все обследования проводились с информационного письменного согласия участников исследования. ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование выполнялось методом ПЦР-ПДРФ анализа. Амплифицированные фрагменты очищали от компонентов ПЦР на магнитных частицах AMPure XP и проводили реакции ресеквенирования по Сэнгеру с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Секвенирование фрагментов гена *SLC26A4* проводили на автоматическом генном анализаторе ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems, USA). Для анализа секвеннограмм использовали программу Chromas v 2.0. Поиск мутаций проводили, сравнивая полученные секвеннограммы исследуемых фрагментов ДНК с референсными последовательностями гена *SLC26A4*. (GenBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

В результате исследований компьютерной томографии височных костей у 165 пациентов с нейросенсорной тугоухостью в одной русской семье у двух сестёр были обнаружены аномалии внутреннего уха Mondini и Eva. Далее у этих сестёр был проведён молекулярно-генетический анализ гена *SLC26A4*. В результате методом прямого ресеквенирования по Сэнгеру у них было обнаружено две различные замены (рис.): одна замена гуанина на аденин в интроне 18 (IVS18+1G>A), а другая замена гуанина на цитозин в 85 нуклеотидном положении (с.85G>A) во 2-м экзоне гена *SLC26A4*. Обе замены найдены в компаунд-гетерозиготном состоянии у обеих поражённых сестёр.

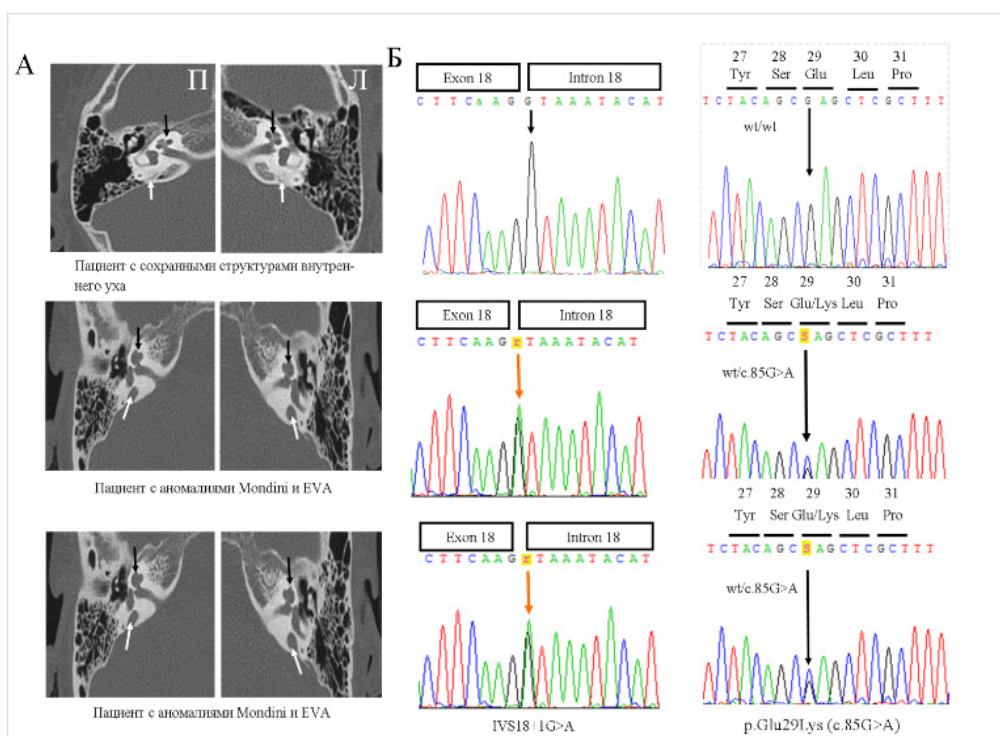


Рис. КТ-изображения височных костей и результаты прямого ресеквенирования по Сэнгеру гена *SLC26A4* у двух сестёр с аномалиями внутреннего уха Mondini и EVA:

А – серия КТ-снимков пирамиды височной кости в аксиальной проекции; Л – левая височная кость; П – правая височная кость; чёрная стрелка-улитка, белая стрелка – полукружные каналы; Б – секвеннограмма фрагмента гена *SLC26A4* (сверху вниз) нормальный генотип с.[wt:wt], компаунд-гетерозиготный генотип с.[85G>C]:[IVS18+1G>A]

По результатам анкетирования о членах родословной, было выявлено, что у этих двух пробандов женского пола родители и пять сибсов имеют нормальный слух, что свидетельствует о вероятности аутосомно-рецессивного типа наследования. Обнаруженная замена в 18-м интроне входит в интрон-экзонную область и вероятно затрагивает сайт сплайсинга, а другая замена с.85G>A, обнаруженная нами во втором экзоне, является несинонимичной и приводит к замене глутаминовой кислоты на лизин в 29-м аминокислотном положении (p.Gly29Lys).

ЛИТЕРАТУРА

1. Everett L.A., Glaser B., Beck J.C. et al. // Nature genetics. 1997. Vol. 17, №. 4. P. 411.
2. Kokotas H., Petersen M.B., Willems P.J. // Clinical genetics. 2007. Vol. 71, №. 5. P. 379–391.
3. Mount D.B., Romero M.F. // Pflügers Archiv. 2004. Vol. 447, №. 5. P. 710–721.

Работа выполнена в рамках госзадания министерства образования и науки РФ №6.1766.2017 и при финансовой поддержке гранта РФФИ (№18-34-00439 мол_а).

КЛЕТОЧНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.В. Ноздрачева¹, Н.М. Плещач², И.М. Спивак^{1,2,3}, М.Л. Куранова²

¹Институт цитологии Российской академии наук, 194064, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9,

E-mail: cellbio@incras.ru; office@spbstu.ru; abiturient@spbu.ru

Согласно международным стандартам диагностики редких наследственных заболеваний, для окончательного диагноза необходимо выявить мутацию. Но в ряде случаев молекулярная диагностика существенно затруднена. Например, при таких заболеваниях, как атаксия-телеангиэтазия (AT, omim:208900), Синдром Секкея1 типа (SCKL1, omim:210600), Синдром Коккейна (CS, omim:216400; omim:133504) и других. В тех случаях, когда исследуемый ген большой и труден для исследования, могут быть полезны дополнительные клеточные методы. Нашей лабораторией были разработаны и апробированы клеточные иммунофлуоресцентные экспресс-методы, помогающие установить функциональную активность киназы АТМ (в случае АТ) и АТР (в случае SCKL1). У шести пациентов с клинической картиной АТ нами были выявлены функциональные нарушения киназы АТМ в разной степени. При этом при клинической картине АТ и наличии у одного пациента сибса с таким же заболеванием молекулярными методами удалось найти патогенные мутации только в половине случаев. Также нашим клеточным методом были детектированы нарушения работы киназы АТМ у пациента, которому изначально ставился диагноз ATLD1. Затем у данного пациента методом NGS секвенирования были выявлены патогенные замены в гене *ATM* и диагноз изменен на АТ.

Также данный клеточный экспресс-метод применяется при диагностике SCKL1. У двух из трёх пациентов с клинической картиной SCKL не было выявлено активной формы киназы АТР, что позволило сделать вывод о нарушении в гене *ATR*, а у пациента с активной формой киназы АТР в дкрмальных фибробластах позднее была выявлена патогенная замена в гене *PHGDH* и диагноз изменён на синдром Ноя-Ласковой.

Учитывая, что методы полногеномного и NGS-секвенирования не идеальны и могут пропустить патогенные замены, а MPLA выявляет только крупные делеции и инсерции, клеточный метод диагностики АТ, SCKL1 может быть и использован при диагностике таких заболеваний, как АТ или SCKL1.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ЦЕЛЬЮ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ АНТРАЦИКЛИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ ВСЛЕДСТВИЕ ХИМИОТЕРАПИИ

Е.П. Омельчук, Д.Ю. Гвалдин, Н.Н. Тимошкина, С.Н. Кабанов, А.Е. Сторожакова

*Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63
E-mail: molcancer@yandex.ru*

Антрациклиновые антибиотики являются неотъемлемой частью схем химиотерапии при лечении рака молочной железы. Однако терапевтическая эффективность антрациклинов сопряжена с развитием различных осложнений, среди которых наиболее распространена кардиотоксичность. Антрациклин-опосредованная кардиотоксичность (АОК) может приобретать различные формы сердечно-сосудистых осложнений, а клинические проявления могут возникать даже после завершения химиотерапии. Высокий риск смертности при данной патологии обусловлен, в том числе, отсутствием точных высокоинформативных прогностических тестов. Поэтому раннее прогнозирование вероятности развития АОК представляется перспективным.

В исследование включено 75 пациенток ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ со злокачественными новообразованиями молочной железы преимущественно II (54,7 %) и III (32 %) стадии заболевания. Возраст больных варьировал от 32 до 70 лет с медианой в 53,5 года. Стандартный режим адъювантной химиотерапии рака молочной железы AC (доксорубин и циклофосфамид) использовался для 46 пациенток, остальные получали последовательно терапию AC с переходом на таксаны и трастузумаб. Количество проведённых курсов адъювантной и неoadъювантной химиотерапии составило от 1 до 16, в среднем 4 курса. Больным проводилась ЭКГ, ЭХО-КС, а также фиксировались сопутствующие патологии. Помимо этого, были выполнены общий и биохимический анализ крови, коагулограмма и общий анализ мочи. Генотипирование геномной ДНК, выделенной из цельной крови, производилось по полиморфизмам rs28714259 и rs8187710 гена *ABCC2* с помощью методики HRM с последующим секвенированием по Сэнгеру.

Ген *ABCC2* кодирует одноименный белок из суперсемейства ABC-транспортёров, которые переносят различные субстраты, в том числе химиопрепараты, через мембраны клеток с использованием энергии АТФ. Предполагается, что полиморфизм rs8187710 (G>A) гена *ABCC2* приводит к изменениям в фармакокинетике антрациклинов, сопряженных с замедлением клиренса, увеличением пиковых концентраций в плазме крови, повреждением кардиомиоцитов и последующими нарушениями сердечной функции.

Генотипирование локусу *ABCC2* показало наличие полиморфизма rs8187710 у девяти пациенток, что, по данным литературы, коррелирует с повышенным риском развития АОК. Частота встречаемости полиморфизма в европейской популяции составляет 13 %, что сопоставимо с полученными нами результатами (12 %). Лабораторные показатели таких больных оказались в пределах нормы. При ЭХО-КС функциональные нарушения работы сердечно-сосудистой системы (ССС) были зафиксированы у трёх пациенток, имевших дикий тип гена *ABCC2*. Сопутствующие патологии со стороны ССС имели шесть пациенток с наличием полиморфизма rs8187710, причем у трёх из них обнаружены патологические изменения ЭКГ. Пациентки с мутацией в гене *ABCC2*, не имевшие сопутствующих заболеваний ССС, также в трёх случаях из девяти показали наличие нарушений в её работе.

Однонуклеотидный полиморфизм rs28714259 (A>G) локализован в некодирующей области 15-й хромосомы. Данная область взаимодействует с другими удалёнными элементами генома и участвует в регуляции сигнального пути глюкокортикоидов. Согласно литературным данным, гетерозиготные и гомозиготные генотипы по rs28714259 коррелируют с риском развития антрациклин-опосредованной

сердечной недостаточности (ОШ = 1,9, $p = 0,04$) и снижением фракции выброса левого желудочка (ОШ = 4,2, $p = 0,018$).

В нашем исследовании впервые проанализирована аллельная частота встречаемости rs28714259 в русской популяции, она составила 0,09 с преобладанием генотипа wild type (GG – 0,81 против GA – 0,19) и отсутствием гомозигот по альтернативному аллелю. Частота минорного аллеля в европейской популяции, по данным популяционной базы GnomAD, аналогичная – 0,09.

Планируется расширение выборки пациенток для дальнейшего генотипирования по полиморфизмам rs8187710 *ABCC2*, rs11549465 *HIF1A*, rs1333049 *CDKN2A/B*, rs13058338 *RAC2*, *CYBA* и rs28714259. Продолжается наблюдение за больными, вошедшими в данное исследование.

Таким образом, генотипирование по rs8187710 гена *ABCC2* и rs28714259 некодирующей области 15-й хромосомы представляется перспективным для определения группы повышенного риска развития АОК и разработки персонализированной терапевтической стратегии для таких пациенток.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА *MBL2* И РИСК РАЗВИТИЯ ГЕПАТИТА В У ЖИТЕЛЕЙ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.Д. Пивоварова

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: virnaptakhadasha@yandex.ru*

Гепатит В является одним из наиболее распространённых заболеваний печени. Его вызывает вирус семейства *Hepadnaviridae* рода *Orthohepadnavirus*. По данным Роспотребнадзора, на 2017 год показатели заболеваемости в России составили 0,9 на 100 тыс. человек для острого гепатита В и 9,6 на 100 тыс. человек – для хронического.

Полиморфизмы в генах различных факторов иммунитета могут повлечь за собой изменение восприимчивости организма к вирусу гепатита В и повлиять на ход развития заболевания. Одним из важнейших факторов врождённого иммунитета является манноз-связывающий лектин (МСЛ) – белок, синтезирующийся в печени. Его основной функцией является активация системы комплемента по лектиновому пути посредством поливалентного связывания лектина с сахарами на поверхности микроорганизмов, что способствует удалению патогенов комплемент-опосредованным фагоцитозом [1, 2].

Наличие полиморфизмов в гене *MBL2* приводит к нарушению экспрессии гена и снижению концентрации белка в сыворотке крови, что может повлечь за собой повышение уязвимости организма по отношению к различного рода патогенам. Так, полиморфизм *Gly54Asp* негативно влияет на экспрессию гена *MBL2* и стабильность синтезируемого им белка [3], а полиморфизм *Gly57Glu* воздействует на структуру коллагеновой области МСЛ таким образом, что она генерирует дефектные взаимодействия с MASP, доменом распознавания углеводов и его мишенью, вследствие чего уровень циркулирующего МСЛ снижается [4].

Нами была получена ДНК 99 ростовчан, 47 из которых с положительными результатами ПЦР на HBV и 52 с отрицательными (составили контрольную группу). В отобранных образцах ДНК анализировали наличие полиморфизмов *Gly57Glu* и *Gly54Asp* в гене *MBL2*. Анализ ПЦР-продуктов проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием рестриктаз *MboII* и *BanI* для полиморфизмов *Gly57Glu* и *Gly54Asp*, соответственно. Разделение продуктов рестрикции проводили методом горизонтального электрофореза в 3 %-ном агарозном геле в течение 30 мин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием закона Харди-Вайнберга и критерия χ^2 . Распределение частот генотипов и аллелей по каждому полиморфизму в обеих группах обследуемых соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

По полиморфизму *Gly57Glu* в исследуемых группах представлены только гомозиготы по нормальной аллели, что подтверждает его крайне низкую частоту среди европеоидов. Следовательно, ассоциации данного полиморфизма с риском развития гепатита В у жителей Ростовской области не обнаружено.

По полиморфизму *Gly54Asp* в ходе исследования обнаружены статистически значимые различия частот аллелей между двумя группами обследуемых. В обеих группах преобладают гомозиготы по аллели *G*. В группе инфицированных Вирусом гепатита В частота генотипа *G/G* составляет 57 %, а в контрольной группе – 78 %. Частота гетерозигот в группе инфицированных гепатитом В составляет 34 %, а в контрольной группе – 23 %. Частота встречаемости генотипа *A/A* в группе инфицированных Вирусом гепатита В составляет 8,5 %, в контрольной же группе данный генотип не обнаружен. При этом частота аллели *G* в группе инфицированных Вирусом гепатита В – 74,5 %, в контрольной группе – 88,5 %; частота аллели *A* в группе инфицированных Вирусом гепатита В – 25,5 %, в контрольной группе – 11,5%. Для аллели *A* ($p=0,01$; $OR=2,63$ (1,23 – 5,62)) наблюдается ассоциация с высоким риском развития гепатита В, а наличие генотипа *GG* снижает такой риск, обладая защитным эффектом ($OR=0,41$ (0,17 – 0,96)).

Таким образом, для жителей Ростовской области ассоциация полиморфизма *Gly57Glu* в гене *MBL2* с риском развития гепатита В не выявлена; полиморфизм *Gly54Asp* в гене *MBL2* ассоциирован с повышенным риском развития гепатита В для аллели *A* и со сниженным – для аллели *G*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eisen D.P., Minchinton R.M. // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2003. Vol. 37, № 11. P. 1496–1505.
2. Scorza M., Liguori R., Elce A. et al. // Clinica Chimica Acta. 2015. Vol. 451. Part A. P. 78–81.
3. Kalia N., Sharma A., Kaur M. et al. A comprehensive in silico analysis of non-synonymous and regulatory SNPs of human MBL2 gene // Springerplus. 2016. № 5. P. 811.
4. Moura T.C.F., Amoras E.S.G., Araújo M.S. et al. // Hindawi. Mediators of Inflammation. 2017. Vol. 2017. P. 1–11.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИН-N-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В РАЗВИТИИ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА И ЕГО ОСЛОЖНЕНИЙ

Т.А. Самгина, Г.Н. Мяснянкина, П.М. Назаренко, А.В. Полоников

*Курский государственный медицинский университет Минздрава России, 305000, Российская Федерация, г. Курск, ул. К. Маркса, 3
E-mail: tass@list.ru*

Лечение, прогнозирование и профилактика осложнений острого панкреатита является важной проблемой современной медицины. Особую роль в регуляции липидного обмена играет фермент фосфатидилэтанолламин-N-метилтрансфераза, который катализирует процесс метилирования фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин. Данные липиды являются основными компонентами мембраны митохондрий и клеточной мембраны, обеспечивают её текучие и пластические свойства, а также участвуют в транспорте жиров, жирных кислот и холестерина. *PEMT* – ген, кодирующий фермент.

Цель исследования – определить роль полиморфизма *PEMT* C/T rs12449964 с риском развития острого панкреатита и его осложнений у русских жителей Центральной России. Образцы цельной крови были собраны у 502 больных острым панкреатитом и 513 здоровых индивидов. Генотипирование полиморфизма выполнено с помощью метода ПЦР с дискриминацией аллелей посредством TaqMan-зондов.

Проведённое исследование показало, что частота аллеля С ($p=0,004$) и генотипа С/С *PEMT* С/Т rs12449964 ($p=0,001$) была выше в группе больных острым панкреатитом, а генотипа С/Т, наоборот, в контрольной группе ($p=0,0002$).

Генотипы С/Т–Т/Т обладали протективным эффектом в отношении развития инфицированного панкреонекроза ($_{\text{cor}}OR=0,51(0,32-0,82)$, $p=0,005^D$), гнойно-некротического перипанкреатита ($_{\text{cor}}OR=0,53(0,34-0,83)$, $p=0,0055^D$) и тяжёлой степени острого панкреатита ($_{\text{cor}}OR=0,52(0,34-0,81)$, $p=0,0033^D$).

Таким образом, нарушение процессов метилирования фосфатидилэтаноламина повышает чувствительность клетки к окислительному стрессу, что может привести к развитию острого панкреатита.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ЭТИОЛОГИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ВРОЖДЁННЫХ ДЕФОРМАЦИЙ ПОЗВОНОЧНИКА У ДЕТЕЙ

*М.В. Согоян¹, С.Е. Хальчицкий¹, С.В. Виссарионов¹, А.Г. Баиндурашвили¹,
А.В. Дмитриев²*

¹Научно-исследовательский детский ортопедический институт им. Г.И. Турнера, 196603, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пушкин, ул. Парковая, 64–68

²Институт экспериментальной медицины, 197376, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

E-mail: sogoyanmarina@mail.ru; s_khalchitski@mail.ru; vissarionovs@gmail.com; turner01@mail.ru; dmitriev10@yandex.ru

Деформация позвоночника различного генеза является одним из распространённых и тяжёлых ортопедических заболеваний детского возраста. Доля врожденных искривлений позвоночника, сформированных в результате аномалий развития тел позвонков в общей структуре деформаций позвоночного столба составляет 3,2 %, при этом около 50 % врождённых деформаций позвоночника имеет прогрессирующий характер течения [1]. Оценка характера течения деформации позвоночника в процессе роста и развития ребёнка остаётся актуальной и нерешённой проблемой у пациентов с врождёнными деформациями [2]. Генетический анализ в настоящее время становится одним из ведущих направлений в исследовании для решения этой задачи. Причины возникновения врождённых деформаций позвоночника, наряду с различными тератогенными воздействиями, лежат в генетической плоскости, когда в силу хромосомных и генных мутаций нарушается нормальный эмбриогенез позвоночного столба, приводящий к возникновению и формированию аномалий развития позвонков.

В наших исследованиях были сформированы рабочие гипотезы возможных молекулярно-генетических факторов, приводящих к возникновению и оценке характера прогрессирования различных форм врожденного сколиоза.

В отношении врождённого сколиоза (ВС) были подвергнуты анализу наиболее распространённые полиморфизмы генов детоксикации и репарации ДНК, имеющие подтверждённое значение в исследованиях других врождённых пороков развития.

Под нашим наблюдением находилось 200 детей с врождёнными деформациями грудного и поясничного отделов позвоночника в возрасте от 1 года 2 месяцев до 16 лет, диагноз у которых был подтверждён при помощи стандартных методов клинической и лучевой диагностики. Молекулярно-генетические исследования проводили путем анализа ряда полиморфных участков в генах 1-й и 2-й стадий детоксикации и репарации ДНК, имеющих клиническое значение в качестве предрасполагающих факторов при ряде врожденных пороков развития. Были исследованы полиморфизмы генов *CYP1A2*, *NAT2*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *XRCC1*, *XRCC3* и их частотное распределение среди больных с

врожденными деформациями позвоночника. Контрольную группу составили здоровые дети того же возраста.

В группе обследованных детей с ВС 79,5 % больных имели делеции генов *GSTM1* или *GSTT1*, а 13,5 % – делецию обоих генов. В контрольной группе делеция того или иного гена этой группы составляла 65,77 %, а обоих генов – 9,47 %. В гене *GSTP1* имеются два полиморфизма – 105Val и 114Val, при которых продуцируется фермент с пониженной активностью. Наше исследование не выявило существенных различий в распределении генотипов *GSTP1* у больных ВС и в контрольной группе, однако 8,5 % больных ВС имели совместное носительство гомозигот по минорной аллели с нулевой аллелью гена *GSTM1*, что в контрольной группе не встречалось. При исследовании гена *NAT2* было выявлено повышение на 35,46 % (9,13 % против 6,74 %) частоты гомозиготного генотипа медленного ацетилятора аллели *6/6 (G590A) у больных ВС по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что носители неблагоприятной аллели среди больных ВС составили 46,36 %, в то время как в контрольной группе – только 21,87 %. Все обследованные больные ВС имели хотя бы одну неблагоприятную аллель генов детоксикации и репарации в гетерозиготном состоянии. Кроме того, у больных ВС общий показатель гомозиготного носительства неблагоприятных аллелей составил 83 % (в контрольной группе – 62,2 %). Ещё более значимым представляется сочетание нескольких неблагоприятных аллелей в гомозиготном состоянии. Такой показатель имелся у 53 % больных ВС, что достоверно отличает их от лиц контрольной группы (22,5 %).

Таким образом, исследование генов детоксикации и репарации ДНК при ВС имеет важное диагностическое и прогностическое значение. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования при данном заболевании позволят более полно и точно проводить диагностику этиологии и прогноза характера течения этого тяжелого инвалидизирующего заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виссарионов С.В., Картавенко К.А., Кокушин Д.Н. и др. // Хирургия позвоночника. 2013. № 2. С. 32–37.
2. Виссарионов С.В., Кокушин Д.Н., Картавенко К.А. и др. // Хирургия позвоночника. 2012. № 3. С. 33–37.

ПРОГРАММА КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ КАРОТИДНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА

А.Д. Татарченко¹, С.С. Амелина^{1,2}, Е.В. Машкина^{1,3}, О.М. Нескубина³, Е.П. Гальбас¹

¹ООО «Наука», 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Тургеневская, 49

²Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

³Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

Заболевания сердечно-сосудистой системы, которые обусловлены атеросклерозом, представляют собой основную причину смертности во всем мире, в том числе и в России (ВОЗ, 2017). Несмотря на множество проведённых исследований, многие вопросы этиологии и патогенеза атеросклероза остаются открытыми. Неоднозначны данные и о ключевых факторах, влияющих на процесс развития атеросклероза и его осложнений. Уточнению и дополнению механизмов развития атеросклероза, поиску прогностических персонифицированных маркеров могут способствовать комплексные исследования межгенного взаимодействия и значимые биомаркеры крови при каротидном атеросклерозе и его проявлениях на разных этапах онтогенеза. Нами разработан и внедрён в практику медицинских учреждений г. Ростова-на-Дону алгоритм для персонифицированной диагностики раннего и позднего каротидного атеросклероза. В основе персонифицированного подхода лежит молекулярно-генетическое тестирование. Становится возможным установить наследственную предрасположенность к опасным заболеваниям и спрогнозировать наиболее вероятный сценарий их развития. Известно, что обязательным

компонентом формирования атеросклеротической бляшки являются межгенные взаимодействия с участием нескольких функциональных семейств генов [1–3].

Программа исследования включала изучение межгенного взаимодействия полиморфных вариантов генов липидного, углеводного обмена, факторов окислительного и противовоспалительного гомеостаза в развитии раннего и позднего каротидного атеросклероза у жителей Ростовской области и проведение факторного анализа по выделению главных компонент, полученных на основе генетических и биохимических показателей в группе пациентов с каротидным атеросклерозом.

Для проведения анализа молекулярно-генетических предикторов раннего и позднего атеросклероза были использованы образцы ДНК из лейкоцитов крови обследуемых пациентов. Для исследований были выбраны следующие полиморфные варианты этих генов: *PPARGC1A*; *LIPC*; *PONI*; *APOE*; *LPL*; *APOC3*; *SERPINE1*, *EDN*. Аллельные разновидности генов исследовали при помощи метода аллель-специфичной ПЦР с применением реагентов «SNP-экспресс» (Производитель Литех, Россия). Продукты амплификации разделяли в 3 %-ном агарозном геле. Общий холестерин, липопротеины низкой плотности, липопротеины высокой плотности, триглицериды, индекс атерогенности, глюкоза, мочевиная кислота были измерены гомогенным ферментативным колориметрическим анализом, используя автоматический биохимический анализатор. Факторный анализ по выделению главной компоненты проводили с использованием пакета программ SPSS Statistics 22.0 (Chicago, USA).

В таблице представлены результаты факторного анализа. В группе с каротидным атеросклерозом, определены два фактора, объясняющие 81,5 % полной дисперсии переменных – 60,2 и 21,3 %, соответственно каждому фактору. На первый фактор – «фактор роста интима-медиа» приходится 60,2 % дисперсии. В этом факторе тесную связь между собой проявляют следующие показатели: наличие полиморфизмов в генах *SERPINE1* и *PONI* с повышенным содержанием холестерина и липидов низкой плотности. Ранее было показано, что *SERPINE1* стимулирует миграцию эндотелиальных клеток, связываясь с липопротеинами низкой плотности. Окисленные ЛПНП стимулируют выход *SERPINE1* в эндотелиальных клетках. Повышенная экспрессия *SERPINE1* играет важную роль в прогрессировании фиброза и очевидно предшествует формированию атеросклеротических бляшек.

Таблица

Результаты факторного анализа по выделению главных компонент, полученных на основе генетических и биохимических показателей в группе пациентов с каротидным атеросклерозом

Показатели	Фактор 1	Фактор 2
<i>LPL</i> (Ser447Ter)	0,212	0,191
<i>LIPC</i> (G -250A)	0,203	-0,106
<i>PPARGC1A</i> (Gly482Ser)	0,313	0,468
<i>PONI</i> (Arg192Gln)	0,419	0,493
<i>EDN</i> (Lys198Asn)	0,059	0,191
<i>SERPINE1</i> (675 5G/4G)	0,379	0,036
Глюкоза	-0,170	0,455
Мочевая кислота	0,057	0,565
Холестерин общий	0,523	0,451
ЛПВП	0,228	0,358
Триглицериды	0,068	-0,061
ЛПНП	0,488	0,261

На второй фактор – «фактор окислительного гомеостаза» приходится 21,3 % дисперсии. В этом факторе тесную связь между собой проявляют следующие показатели: наличие полиморфизмов в генах *PPARGC1A* и *PONI*, а также биохимические показатели, такие как мочевиная кислота, глюкоза крови и холестерин. Мочевина кислота является мощным антиоксидантом и её увеличение у больных атеросклерозом коррелирует с наличием полиморфизмов генов *PPARGC1A* и *PONI* у больных атеросклерозом.

Таким образом, разработан и внедрён в практику медицинских учреждений г. Ростова-на-Дону алгоритм для персонифицированной диагностики раннего и позднего каротидного атеросклероза,

основанный на определении полиморфизмов в пяти генах: *LIPC(G-250A)*, *LPL(Ser447Ter)*, *PPARGC1A(Gly482Ser)*, *PONI(Gln192Arg)*, *EDN(Lys198Asn)*. В зависимости от количества регистрируемых у пациента полиморфизмов и их сочетаний делается прогноз о степени риска проявления атеросклероза в определённом возрасте.

Принятие и внедрение концепции персонифицированной медицины по согласованному мнению медицинского сообщества позволит значительно улучшить качество диагностики, лечения и, самое главное, предупредить болезнь.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Derevyanchuk E.G., Nguyen T.T., Neskubina O.M.* // Online Journal of Health and Allied Sciences. 2014. Vol. 13, № 4. 4 p.
2. *Нескубина О.М.* Межгенные взаимодействия в развитии раннего и позднего каротидного атеросклероза. Автореф. дис. ... кандидат. мед. наук. Белгород, 2019. 24 с.
3. *Нескубина О.М., Машкина Е.В., Шкурат Т.П.* // Валеология. 2017. № 4. С. 62–65.

АНАЛИЗ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА И ГЕНА *FTO* ПРИ ЭКЗОГЕННО- КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ У ПОДРОСТКОВ

О.В. Бочарова¹, Е.Д. Теплякова², А.В. Мекеня¹

¹Детская городская поликлиника № 4 г. Ростова-на-Дону, 344065, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Днепровский, 122/1

²Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

E-mail: sharmia@yandex.ru

В последние годы важным становится фактор поиска генетических предикторов ожирения и их межгенных ассоциаций, как для формирования групп риска, так и для разработки персонализированной диеты на основе нутригенетических данных.

Целью данной работы было определение степени межгенного взаимодействия генов липидного обмена и гена *FTO* у подростков Ростовской области при экзогенно-конституциональном ожирении 1–2-й степени.

Для молекулярно-генетического исследования образцы ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови. В исследовании приняли участие 327 подростков в возрасте 14–17 лет с индексом массы тела (ИМТ) >30. Среди них – 158 девочек и 169 мальчиков. Контрольную группу составили 125 подростков обоего пола в возрасте 14–17 лет с ИМТ <20. В соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (с поправками 2000 г.), а также «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (утверждены Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266) все исследования были проведены с информированного согласия пациентов и их родителей.

Генотипирование выполняли методом аллельспецифичной амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Анализировали следующие аллельные варианты генов *G250A LIPC* (rs2070895); *Gln192Arg PONI* (rs662); *Ser447Ter LPL* (rs328); *A23525T FTO* (rs9939609). Для анализа межгенных взаимодействий генов-кандидатов использовали биоинформационный метод – Multifactor Dimensionality Reduction (программа MDR, версия 3.02 <https://www.multifactordimensionalityreduction.org/>). основанный на методе логистической регрессии. При проведении этого вида расчётов сравнивали данные индивидов с ИМТ >30 и с ИМТ <20.

Проведённое исследование выявило особенности влияния мутаций в рассмотренных локусах генов *LIPC*, *PONI*, *LPL* и *FTO* на метаболизм липидов и его нарушение у подростков, проживающих в Ростовской области. Анализ межгенных взаимодействий локусов изученных генов позволил установить

сочетания генотипов при экзогенно-конституциональном ожирении 1–2-й степени у подростков. Отмечены достоверные различия в распределении частот генотипов и аллелей рассмотренных генов в группах индивидуумов, различающихся по ИМТ. На рисунке приведены результаты исследований межгенных взаимодействий генов липидного обмена и гена *FTO* при экзогенно-конституциональном ожирении 1–2-й степени у подростков.

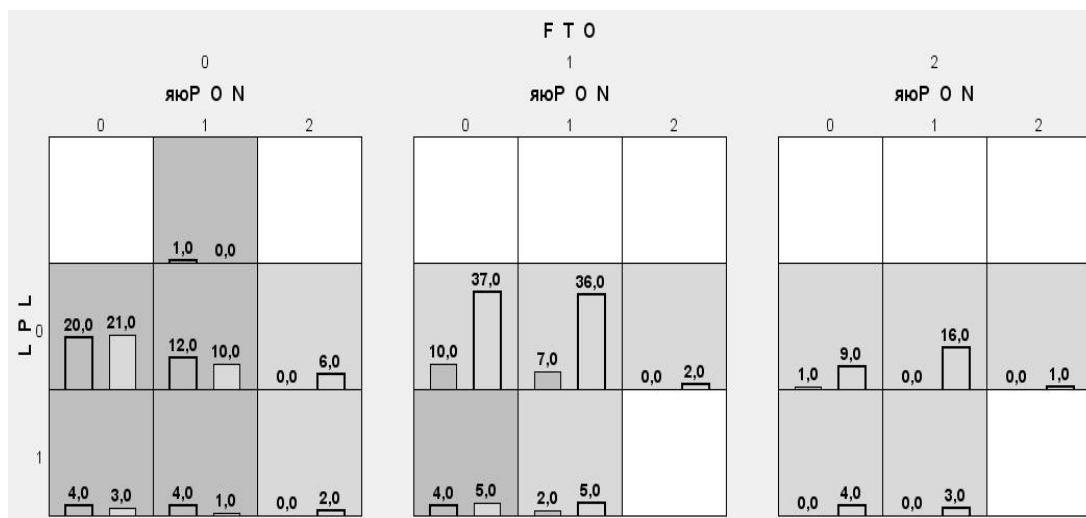


Рис. Межгенные взаимодействия генов липидного обмена у подростков при экзогенно-конституциональном ожирении 1–2-й степени

Для трёхлокусной модели межгенного взаимодействия проведён кластерный анализ и построена диаграмма взаимодействия полиморфных вариантов генов системы липидного обмена. Выраженная степень взаимодействия генов наблюдается между генами *FTO – PON1 – LPL*. Сбалансированная точность при взаимодействии генов *FTO – PON1 – LPL* у подростков при экзогенно-конституциональном ожирении 1–2-1 степени равна 0,72. Воспроизводимость – 10/10.

Огромная медико-социальная значимость самого ожирения, а также заболеваний, связанных с ожирением, манифестирующих в детском возрасте, поиск новых путей персонализированной терапии определяет актуальность дальнейших исследований в этом направлении.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АССОЦИАЦИЙ РАННЕГО КАРИЕСА ЗУБОВ У ДЕТЕЙ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

И.Г. Удина¹, В.С. Учаева¹, В.В. Волобуев², А.С. Грачева¹, Ю.А. Васильев²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3

²Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, 350063, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. Седина, 4

E-mail: irina_udina@mail.ru, yurii-59@mail.ru

В настоящее время некоторые исследователи, проводят поиск специфических молекулярных маркеров, ассоциированных с кариесом у детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области (ВПР ЧЛО) [1]. По имеющимся данным, важную роль в развитии кариеса у детей с ВПР ЧЛО имеет гигиена [1–3]. По данным [4], SNP A66G гена *MTRR* ассоциируется с развитием ВПР ЧЛО, а, по данным [5], является маркером раннего кариеса. В этой связи мы провели исследование особенностей

распространения SNP A66G гена *MTRR* у детей с ВПР ЧЛО и у детей без патологии в зависимости от интенсивности кариеса с целью установления роли этого маркера в ассоциации с ранним кариесом и с развитием ВПР ЧЛО.

В исследование включены дети с врождёнными изолированными расщелинами губы и/или нёба ($N=61$) и дети без патологии ($N=91$) с временным и смешанным прикусом, проживающие в Краснодарском крае. Дети изучены на базе детской краевой клинической больницы и стоматологической поликлиники Кубанского государственного медицинского университета (КубГМУ). У детей взяты соскобы буккального эпителия в ротовой полости, из которых выделена ДНК с помощью наборов “Изоген” (Москва). Определение стоматологического статуса у детей без патологии осуществлялось путём осмотра в амбулаторных условиях, а для детей с ВПР ЧЛО – 69 % по данным осмотра перед поступлением в ЛПУ, для остального сведения о стоматологическом статусе получены из медицинских карт. Работа одобрена этическим комитетом КубГМУ. Интенсивность кариеса определяли по [6]. Сравнение выборок детей с ВРГ, ВРН и ВРГН и детей без патологии выявило ассоциацию SNP A66G гена *MTRR* с рассматриваемыми пороками развития, что не позволило установить вероятную связь этого маркера с кариесом (для генотипа G/G отмечен повышенный риск развития ВПР ЧЛО: OR = 2,16, $p = 0,046$, 95 % CI (1,00–4,67)). У детей без патологии выявлена ассоциация по SNP A66G гена *MTRR* с ранним кариесом. Для носителей генотипа A/A среди детей с временным и смешанным прикусом ($N=91$) со средним возрастом $6,51 \pm 0,2$ повышен риск развития интенсивной формы кариеса (декомпенсированной и субкомпенсированной формы – ДФК и СФК): OR = 4,91, $p = 0,006$, 95 % CI (1,53–15,78), а среди детей с временным прикусом ($N=53$) со средним возрастом $4,71 \pm 0,18$ – OR = 10,53, $p = 0,024$, 95 % CI (1,19–485,29).

Для носителей гетерозиготного генотипа A/G отмечена устойчивость к более интенсивной форме кариеса (субкомпенсированной и декомпенсированной), как для детей с временным прикусом, так и для объединённой группы детей с временным и смешанным прикусом. Для детей с постоянным прикусом не выявлена роль рассматриваемого маркера в развитии кариеса. Таким образом, SNP A66G гена *MTRR* может быть рассмотрен как маркер раннего кариеса у детей без врождённой патологии. На основе полученных данных можно сделать вывод об ассоциации SNP A66G гена *MTRR* с ранним кариесом. Для носителей генотипа A/A среди детей с временным прикусом, а также среди детей с временным и смешанным прикусом достоверно повышен риск развития раннего кариеса в интенсивной форме (ДФК и СФК). Для носителей гетерозиготного генотипа A/G отмечена устойчивость к более интенсивной форме кариеса (ДФК и СФК), как для детей с временным прикусом, так и для объединённой группы детей с временным и смешанным прикусом. У детей с ВПР ЧЛО с временным и смешанным прикусом также рассмотрены особенности распространения SNP A66G гена *MTRR*. Однако ассоциацию с кариесом не выявили. Вероятно, установленная ассоциация G/G с развитием ВПР ЧЛО отчасти нивелирует возможность изучения этого маркера как маркера раннего кариеса в данной группе детей. Кроме того, для детей с ВПР ЧЛО с временным и с временным и смешанным прикусом средний возраст несколько выше, чем в аналогичных группах детей без патологии, соответственно $6,00 \pm 0,21$ и $8,05 \pm 0,27$. Различия по возрасту в сравниваемых группах могут приводить к искажениям в исследовании. Помимо этого, искажения в исследовании могут быть привнесены из-за относительно небольшой выборки детей с ВПР ЧЛО и получения информации о стоматологическом статусе детей, как из медицинских карт, так и за счет осмотра стоматологами. Для детей без патологии стоматологический статус определял один стоматолог, что исключает возможность расхождений в оценках стоматологического статуса. Кроме того, для детей с ВПР ЧЛО отмечена множественная стоматологическая патология [7], что требует более специфичных критериев при оценке интенсивности кариеса [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Удина И.Г., Гуленко О.В. // Генетика. 2018. № 4. С. 426–434. Doi: 10.7868/S0016675818040045
2. Rodrigues R., Fernandes M.H., Bessa Monteiro A. et al. // Int. J. Dent. Hyg. 2019. Vol. 17. № 2. P. 130–141. Doi: 10.1111/idh.12385.
3. Гуленко О.В., Волобуев В.В., Васильев Ю.А. и др. // Российский стоматологический журнал. 2018. Т. 22. № 4. С. 188–192. Doi: 10.18821/1728-2802-2018-22-4-188-192

4. Wang W., Jiao X.H., Wang X.P. et al. // Genet. Test. Mol. Biomarkers. 2016. Vol. 20. № 6. P. 297–303. Doi: 10.1089/gtmb.2015.0186
5. Antunes L.A., Machado C.M., Couto A.C. et al. // Caries Res. 2017. Vol. 51. № 2. P. 102–108. Doi: 10.1159/000451037
6. Виноградова Т.Ф. Диспансеризация детей у стоматолога. М.: Медицина, 1988. 256 с.
7. Rullo R., Festa V.M., Rullo R. et al. // Eur. J. Paediatr. Dent. 2015. Vol. 16. № 3. P. 229–232.
8. Koryucsu M., Kasimoğlu Y., Seymen F. et al. // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 2018. Vol. 125. № 4. P. 307–312. Doi: 10.1016/j.oooo.2018.01.007.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 0112-2019-0001 «Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции».

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН С ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

П.А. Усольцева^{1,2}, Т.О. Холодная², А.А. Александрова¹

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Областной консультативно-диагностический центр, 344000, г. Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127
E-mail: aalexandrova@mail.ru

Рак шейки матки (РШМ) является четвёртой наиболее распространённой формой рака у женщин, и седьмой по распространённости формой рака в целом. Среднегодовой темп прироста показателей заболеваемости раком шейки матки в России составляет 2,2 %. Основной причиной данного заболевания является вирус папилломы человека (ВПЧ). Инфицированию вирусами папилломы человека подвергается основная масса женщин в течение жизни. Однако в большинстве случаев происходит самопроизвольная элиминация без клинических проявлений инфекции. Эффективность иммунного ответа организма, зачастую, определяет течение папилломавирусной инфекции и вероятность развития онкологических изменений. Полиморфные варианты генов, кодирующих некоторые факторы иммунной системы, могут влиять на эффективность их экспрессии и, соответственно, на иммунологическую чувствительность организма к ВПЧ.

Целью исследования явилось изучение функциональной роли однонуклеотидных полиморфизмов генов иммунной системы, таких как *IL1b*, *TLR4* в развитии рака шейки матки у женщин, а также проведение ретроспективного анализа заболеваемости онкопатологиями шейки матки и частоты распространённости различных высокоонкогенных типов ВПЧ у жительниц Ростовской области.

Для ретроспективного исследования были использованы данные более чем 250 000 образцов соскобов цервикального канала, а для молекулярно-генетического исследования – образцы ДНК, выделенной из цервикальных соскобов 50 женщин, проживающих в Ростовской области. Среди них – 25 женщин с диагнозом плоскоклеточная интраэпителиальная неоплазия низкой степени (LSIL) в сочетании с папилломавирусной инфекцией и 25 женщин с нормальной цитологической картиной шейки матки без носительства вирусов папилломы человека, составляющих контрольную группу. Формирование групп обследуемых было осуществлено на базе Лаборатории клинической патоморфологии и молекулярно-биологических исследований ГАУ РО «ОКДЦ». В работе использовались метод жидкостной цитологии (BD Surepath™), качественное определение ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска тест-системой COBAS HPV, (ПЦР); сорбентный метод выделения ДНК; аллель-специфичная ПЦР и электрофорез.

У жительниц Ростовской области частота диагностирования LSIL составила ~15,14 %, частота CIN I–III и рака шейки матки ~0,93 %. Максимальная частота диагностирования LSIL наблюдалась

у женщин до 20 лет. Возрастное распределение женщин с группой диагнозов LSIL, CIN и рак шейки матки показывало максимальную долю их обнаружения у лиц в возрасте 31–40 лет.

Распространённость генитальной инфекции, вызываемой ВПЧ, в мире составляет около 440 млн человек. Сведения о частоте инфицированности ВПЧ ВКР различных популяционных групп женского населения России противоречивы. Обследование 12 000 тыс. российских женщин показало, что ВПЧ ВКР обнаруживался почти у каждой пятой пациентки. Частота обнаружения 16 и/или 18 типов ВПЧ превосходила частоту обнаружения других типов в любой возрастной группе. Интересна тенденция изменения соотношения выявления 16 и 18 типов к другим типам ВПЧ. Так, в возрасте до 20 лет 16 и 18 типы регистрировались в 1,5 раза чаще, тогда как в возрастных группах от 21 до 40 лет частота обнаружения 16 и 18 типов в 4 раза больше, чем частота обнаружения других типов ВПЧ. После 40 лет отношение регрессировало к первичным значениям. Полученные данные коррелируют с данными литературы, в которых указывается, что суммарно на долю 16 и 18 типов ВПЧ приходится 45 % от общего числа генитальных папилломавирусов. В России по частоте встречаемости лидирует ВПЧ 16 типа, однако встречаемость данного типа значительно варьирует в различных регионах Российской Федерации.

Известно, что более 90 % случаев инфицирования ВПЧ заканчиваются самопроизвольной элиминацией вируса. Даже в случае персистирующей инфекции, переход от поражения шейки матки низкой степени к раку может занять 10–15 лет. Несмотря на то, что с возрастом частота обнаружения вируса падает, уменьшение риска раковых поражений цервикального канала может компенсироваться возрастными изменениями иммунной системы и гормонального фона женщин. Эти данные указывают на безусловное влияние дополнительных факторов в развитии онкопатологии цервикального канала. Анализ частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *T-511C* гена *IL1b* среди женщин с LSIL в сочетании с папилломавирусной инфекцией статистически значимых различий между ними и группой здоровых женщин и не выявил.

Исследование частоты встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *Thr399Ile* гена *TLR4* среди женщин с LSIL в сочетании с папилломавирусной инфекцией показало, что среди исследуемых образцов преобладали гомозиготы по аллели *Thr*. В группе женщин с диагнозом LSIL в сочетании с папилломавирусной инфекцией частота гомозигот по аллели *Thr* в 1,3 раза ниже по сравнению с группой здоровых женщин ($p < 0,18$). Частота гомозигот по аллели *Ile* среди женщин с диагнозом LSIL в сочетании с папилломавирусной инфекцией в 3,5 раза больше по сравнению со здоровыми женщинами ($p < 0,18$). Частота встречаемости аллели *Ile* в 399-м положении белка среди женщин с диагнозом LSIL в сочетании с папилломавирусной инфекцией в 1,9 раза больше по сравнению со здоровыми женщинами ($p < 0,05$). Выявлены статистически значимые различия в частотах аллелей между группами здоровых женщин и группой женщин с LSIL в сочетании с папилломавирусной инфекцией. Аллель *Ile* в 399-м положении белка гена *TLR4* ассоциирована с риском развития плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазии низкой степени, *OR* (относительный риск) составил 2,45 ($p < 0,05$).

Исследование выполнено в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ по теме: «Исследования функциональной роли генетических полиморфизмов и микроРНК в геноме человека и животных», проект № 6.6762.2017 БЧ.

СКРИНИНГ РЕДКИХ ЗАМЕН В ГЕНАХ, ВОВЛЕЧЁННЫХ В ДИСГЕНЕЗ УГЛА ПЕРЕДНЕЙ КАМЕРЫ ГЛАЗА У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЁННОЙ ГЛАУКОМОЙ

***В.С. Фишман¹, Э.С. Валеев¹, П.С. Белокопытова¹, О.В. Фенькова², С.В. Михайлова¹,
А.Ж. Фурсова², М.И. Воевода^{1,3}, Д.Е. Иванощук^{1,3}***

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. ак.Лаврентьева, 10, e-mail: dinara2084@mail.ru

²Государственная Новосибирская областная клиническая больница, 630087, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130

³Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СОРАН, 630089, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

Email: minja-f@yandex.ru; regnveig@yandex.ru; belka2195@mail.ru; olga.fenkova@yandex.ru; mikhail@bionet.nsc.ru; anzhellafursova@yandex.ru; mvoevoda@ya.ru; dinara2084@mail.ru

Врожденная глаукома (ВГ) является наиболее частой причиной прогрессирующей потери зрения у детей. К развитию этой редкой патологии приводят аномалии развития переднего угла и дренажной системы глаза, возникающие вследствие воздействия на плод различных патологических агентов в период беременности, либо в результате генетических аномалий. Специфические мутации гена *CYP11B1* являются наиболее частой причиной развития ВГ, однако большое количество пациентов с фенотипом ВГ не являются носителями мутантных аллелей данного гена. В настоящее время известны гены, мутации в которых ассоциированы с аутосомно-доминантным и рецессивным типами дисгенеза угла передней камеры глаза, в том числе и с неполной пенетрантностью.

Целью данного исследования является поиск функционально значимых замен в генах *LAMB2*, *JAG1*, *PITX2*, *FOXC1*, *FOXC2*, *FOXE3*, *PAX6*, *COL4A1*, *B3GALTL*, *BMP4* и *SPAMD8*, ранее показавших ассоциацию с аномалиями развития переднего угла камеры глаза [1, 2], у *CYP11B1* – негативных пациентов методом экзомного секвенирования.

Методом экзомного секвенирования у 10 *CYP11B1*-негативных неродственных пациентов (без отягощённого семейного анамнеза) с фенотипом ВГ были проанализированы кодирующие участки генома и прилегающие сайты сплайсинга. Полноэкзомный анализ был выполнен на платформе Illumina NextSeq550 (Illumina, Calif., USA) с последующим проведением биоинформационного анализа. Варианты с частотой более 1 % были исключены из анализа, также учитывались данные тестирования *in silico* (PolyPhen-2, Provean и Mutation Taster) и данные баз HGMD и ClinVar.

В результате анализа нами не были обнаружены ранее описанные патологически значимые замены в генах *LAMB2*, *JAG1*, *PITX2*, *FOXC1*, *FOXC2*, *FOXE3*, *PAX6*, *COL4A1*, *B3GALTL*, *BMP4* и *SPAMD8*. У одного пациента была обнаружена низкочастотная замена в гене *LAMB2* rs143405268 в гетерозиготном варианте с отсутствием описания клинического эффекта в базах данных, но предсказанная Mutation Taster и PolyPhen как потенциально патологически значимая (disease causing with score: 110 и possibly damaging with a score of 0,472), а Provean как нейтральная (score – 1,389). Этот ген кодирует ламинин бета 2 и мутации в нём являются причиной возникновения синдрома Пирсона, а у некоторых носителей мутаций наблюдается широкий спектр фенотипических проявлений, включая гипоплазию радужной оболочки, катаракту, глаукому и дисгенез угла передней камеры [1]. Обнаруженная новая гетерозиготная замена в 16-м интроне гена *COL4A1* (IVS 16 +10 A\G) потенциально может влиять на образование альтернативных форм сплайсинга. Ген *COL4A1* кодирует альфа субъединицу коллагена IV типа и играет важную роль в формировании базальной мембраны. Мутации в этом гене (в том числе и сайтах сплайсинга) могут быть причиной различных неврологических симптомов и аномалий развития мозга, а также дисгенеза внутриглазных структур, приводя к ранней офтальмопатологии [1].

Обнаруженные нами у пациентов редкие мутации rs143405268 гена *LAMB2* и IVS16 +10 A\G гена *COL4A1* вероятно вносят вклад в формирование фенотипа ВГ в сочетании с неизвестными на данный момент вариантами других генов. Целесообразен дальнейший анализ генов, участвующих в развитии внутриглазных структур, у пациентов с ВГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reis L.M., Semina E.V. // Curr. Opin. Ophthalmol. 2011. Vol. 22. P. 314–324.
2. Cheong S.S., Hentschel L., Davidson A.E. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2016. Vol. 99. P. 1338–1352.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-315-00297 и ГЗ №0259-2019-0009.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА rs9939609 ГЕНА *FTO* У АРАБОВ И РУССКИХ ПРИ ОЖИРЕНИИ

Абд Али Алаа Хашиим¹, Т.П. Шкурат²

¹Кафедра технологии медицинских лабораторий, факультет здоровья и медицинских технологий г. Куфа, Средний Евфратский технический университет, г. Куфа

²Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: tshkurat@sfedu.ru

Развитие ожирения связано с образом жизни и генетическими механизмами. Ожирение – серьезная проблема общественного здравоохранения, представляет собой многофакторную болезнь, вызванную как экологическими, так и генетическими факторами. Полиморфизм rs9939609 гена *FTO*, ассоциированный с жировой массой и ожирением (Fat mass and obesity-associated), представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), который расположен в первом интроне гена *FTO*. Изучению полиморфизма этого гена посвящено большое количество работ, которые показали, что его частота существенно различается в разных этнических популяциях [1–3].

В данной работе мы провели сравнительный анализ частот распространения полиморфизма rs9939609 гена *FTO* у арабов (Ирак) и русских (юг России).

Обследовали 120 арабов, проживающих в Ираке, и 136 русских, проживающих на Юге России с ИМТ > 25 кг/м² с определением антропометрических и биохимических показателей. Контрольную группу составили 50 арабов и 132 русских без ожирения. Генотипирование выполняли методом аллельспецифичной амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов, комплементарных полиморфному участку ДНК. У арабов, проживающих в Ираке, при ожирении зарегистрировано следующее соотношение генотипов:

27,7 % *TT* : 49,9 % *TA* : 22,4 % *AA*, и

19,1 % *TT* : 50,0 % *TA* : 30,9 % *AA* соотношение генотипов у русской популяции. .

Как видно из представленных результатов, в популяции арабов, проживающих в Ираке, больше регистрируется гомозигот с генотипом *TT*, чем у русских при ожирении. При этом число гетерозигот практически одинаково.

Результаты показали, что существуют достоверные различия в частоте аллелей *T* (0,52) и *A* (0,47) в популяции Ирака, и популяции русских *T* (0,44) и *A* (0,56), проживающих на юге России. Антропометрические показатели при ожирении у носителей генотипов *AA*, *AT* и *TT* достоверно не различались. Полиморфный маркер rs9939609 гена *FTO* ассоциирован с увеличением индекса массы тела (ИМТ), как у арабов, так и у русских. Выявлено, что у русских жителей *AA* генотип ассоциирован с повышенным уровнем глюкозы плазмы крови в сравнении с пациентами с гетерозиготным генотипом и гомозиготным *TT*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wählén K, Sjölin E, Hoffstedt J. // J. Lipid Res. 2008. Vol. 49 (3). P. 607–611.*
2. *Shahid A., Rana S., Saeed S., et al. // Biomed Res.Int. 2013. Vol. 2013. P. 324093. Doi: 10.1155/2013/324093.*
3. *Mustafa N.J., Nahi Y.Y. et al. // Iraqi JMS. 2016. Vol. 14(3).*

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *XRCC1 Arg280His* И *Arg399Gln* С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ПАТОСПЕРМИИ

*Т.А. Шерчкова^{1,2}, С.В. Ломтева³, К.Ю. Сагамонова³, О.В. Лянгасова¹,
А.А. Александрова^{1,2}, Т.П. Шкурат^{1,2}*

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Клинико-диагностическая лаборатория «Наука», 344002, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Тургеневская, 49

³ООО «Центр репродукции человека и ЭКО», 344068, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, 90А

E-mail: tsherchkova@sfedu.ru; tshkurat@yandex.ru

Анализ гена *XRCC1* играет важную роль в понимании процессов репарации ДНК у млекопитающих. Нарушение функциональной активности гена *XRCC1* в сочетании с воздействием неблагоприятных факторов внешней среды, таких как ионизирующая радиация, ультрафиолетовое излучение, пероксид водорода и другие, опосредуют накопление одностранных разрывов в ДНК, а также повышенный уровень хромосомных aberrаций [1]. Показано, что экспрессия гена *XRCC1* в сперматогенных клетках и клетках Сертоли семенников мыши [2] и бабуина [3] выше, чем в других тканях. Это позволяет предположить, что данный ген может играть важную роль во время сперматогенеза при восстановлении повреждений ДНК в ходе мейоза. Нокаут *XRCC1* в первичных половых клетках самцов мыши приводит к повышению уровня продукции активных форм кислорода, дисфункции митохондрий, апоптозу и потере сперматогониальных стволовых клеток (SSC) в яичках [4]. В 2019 г. Singh с группой учёных выявили снижение экспрессии мРНК и белка *XRCC1* в эякуляте мужчин с различными типами патоспермии в сравнении с испытуемыми с нормозооспермией. Однако исследования по изучению связи полиморфизмов гена *XRCC1* с мужским бесплодием на данный момент немногочисленны и противоречивы.

Цель исследования – рассмотреть полиморфизмы гена *XRCC1 Arg280His* и *Arg399Gln* как молекулярно-генетические маркеры патологий сперматогенеза.

Данные для исследования были получены на базе «Центра репродукции человека и ЭКО» и Клинико-диагностической лаборатории «Наука». На основании показателей спермограмм 129 мужчин в возрасте от 26 до 40 (33,2±4.1) лет были сформированы группы в соответствии с наличием или отсутствием патологии мужской репродуктивной системы: первая группа с нормальными показателями спермограммы (56 человек), вторая группа с астенозооспермией (37), третья – с олигозооспермией (36), а также четвертая – с патоспермией (объединённые выборки с астено- и олигозооспермией). Определение полиморфизмов *Arg280His* и *Arg399Gln* гена *XRCC1* проводилось методом полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 3 %-ном агарозном геле.

Для полиморфизма *Arg280His* гена *XRCC1* по распределению частот аллелей и генотипов обнаружены статистически значимые различия между группами с нормозооспермией и различными типами патоспермии. Отношение шансов показывает, что у группы испытуемых с олигозооспермией мутантная аллель встречается в 5,19 раза чаще, чем у испытуемых с нормозооспермией, гомозиготность по мутантной аллели наблюдается в 4,77 раза чаще, гетерозиготное носительство мутантной аллели встречается в 4,26 раза чаще. В объединённой группе с патоспермией выявлено повышение частоты встречаемости редкой аллели гена *XRCC1* в 4,47 раз, а частота встречаемости гомозиготного редкого генотипа и гетерозигот повышена, соответственно, в 3,95 и 3,48 раз. Для полиморфизма *Arg399Gln* исследуемого гена статистически значимых различий между анализируемыми группами не выявлено.

Статистически значимое повышение частоты встречаемости мутантной аллели и редкого генотипа полиморфизма *Arg280His* гена *XRCC1* при различных типах патоспермии имеют важное значение в поиске молекулярно-генетических маркеров патоспермии, а также в продвижении проблемы предиктивной диагностики заболеваний мужской репродуктивной системы в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ji G., Gu A., Zhou Y. et al. // PloS one. 2010. Vol. 5, № 10. P. e13145.
2. Zhou Z. Q., Walter C. A. // Mutation Research Letters. 1995. Vol. 348, № 3. P. 111–116.
3. Ahmed E. A., de Boer P., Philippens M. E. et al. // Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2010. Vol. 683, № 1–2. P. 84–90.
4. Xu C., Xu J., Ji G. et al. // The FASEB Journal. 2019. C. fj. 201801962RR.

ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНОМЕ КЛЕТОК ПРИ СТРЕССЕ И ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

В.Д. Щербинина

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

E-mail: sherbinina.veronika2014@yandex.ru

В современном стремительном мире человек ежедневно подвергается воздействию множества факторов, преимущественно психоэмоциональной природы, которые могут привести к стресс-реакции. Важную роль в развитии организменного стресса играют молекулярно-генетические процессы, ведущие к долгосрочному изменению функционирования центральной нервной системы, посредством эпигенетических модификаций ДНК и гистонов [1]. Периферические органы, находящиеся под контролем нервной системы, реагируют на её стрессорное состояние изменениями на всех уровнях. Если регуляторных модификаций генома оказывается недостаточно для приспособления к условиям среды, то возникают структурные изменения, такие как хромосомные aberrации и щелочно-лабильные сайты [2]. При длительном воздействии стрессора увеличивается количество изменённых клеток, что ведёт к патологическим отклонениям на организменном уровне.

Патогенез многих психических расстройств, таких как ПТСР [3], депрессия [4, 5], биполярное расстройство, шизофрения [5], также включает эпигенетические изменения генома. Это открывает новые возможности для лечения данных заболеваний путём поиска специфических ингибиторов для ферментов, модифицирующих ДНК и гистоны при патологических состояниях [5].

Таким образом, дестабилизация генома клеток, возникающая в попытке организма приспособиться к условиям среды, может привести как к регулярным и даже микроэволюционным последствиям, так и к патологическим, в зависимости от природы и времени воздействия стрессора и индивидуальных особенностей организма. Изучение механизмов регуляции стабильности генома играет немаловажную роль в развитии диагностики и лечения стресс-индуцированных состояний и психических расстройств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Griffiths B.B., Hunter R.G. // *Neuroscience*. 2014. Vol. 275. P. 420–435.
2. Daev E.V., Petrova M.V., Onopa L.S. et al. // *Russian Journal of Genetics*. 2017. Vol. 53. № 10. P. 1105–1112.
3. Zannas A.S., Provencal N., Binder E.B. // *Biological Psychiatry*. 2015. Vol. 78. Issue 5. P. 327–335.
4. Kraus C., Kadriu B., Lanzenberger R. et al. // *Translational Psychiatry*. 2019. Vol. 9 (1). P. 127.
5. Karsli-Ceppioglu S. // *Drug Dev Res*. 2016. Vol. 77. P. 407–413.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКЕРА rs1208 ГЕНА NAT2 С ВОЗРАСТОМ В ТРЁХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

*В.В. Эрдман¹, Т.Р. Насибуллин¹, И.А. Туктарова¹,
Я.Р. Тимашева¹, Т.В. Викторова², О.Е. Мустафина¹*

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, 450054, Российская Федерация, г. Уфа, Проспект Октября, 71

²Башкирский государственный медицинский университет, 450008, Российская Федерация, г. Уфа, ул. Ленина, 3

E-mail: danivera@mail.ru

Общемировая тенденция к увеличению средней продолжительности жизни населения влечёт за собой возрастание численности людей старческого возраста. Так как стареющий организм особенно предрасположен к заболеваниям, с возрастом увеличивается количество используемых лекарственных средств (ЛС) и, как следствие, растёт частота неблагоприятных эффектов от их применения. В связи с этим важно прогнозировать эффективность применения ЛС с коррекцией на возраст и учитывать популяционные особенности полиморфного состояния генов, этническую принадлежность.

Ген *NAT2* кодирует аминокислотную последовательность ацетилтрансферазы-2 (*NAT2*, ариламин-N-ацетилтрансфераза 2, ЕС 2.3.1.5, 290 а.о., 33 кДа). Этот цитоплазматический фермент второй фазы метаболизма ксенобиотиков катализирует реакцию переноса ацетильной группы с ацетил-КоА на метаболизируемое вещество. В популяциях народов мира наблюдается варибельность по активности фермента *NAT2* и, соответственно, по скорости ацетилирования ксенобиотиков, в том числе ЛС. В связи с этим людей подразделяют на «быстрых», «промежуточных» и «медленных» ацетиляторов. Такие фенотипические различия генетически детерминированы. Они обусловлены, главным образом, однонуклеотидными заменами (SNP – single nucleotide polymorphism) в структурной области гена *NAT2*. SNP rs1208 гена *NAT2* (экзон 2, с.803A>G, *Lys268Arg*) является одним из наиболее важных вариантов, ассоциированных с фармакогенетическими эффектами.

Цель данного исследования заключалась в анализе популяционного и возрастзависимого распределения частот аллелей и генотипов по полиморфному локусу rs1208 гена *NAT2* в трех этнических группах жителей Республики Башкортостан.

Материалом послужили образцы ДНК 1 240 мужчин и женщин в возрасте от 21 до 109 лет, не родственных между собой, русских, татар и башкир по этнической принадлежности. Идентификацию аллельных вариантов генов проводили методом РТ-ПЦР с использованием TaqMan-зондов. Статистический анализ результатов исследования осуществляли в программе SPSS (V. 21.0). При сравнении групп индивидов разного возраста по частотам генотипов и аллелей применяли точный критерий Фишера.

Согласно результатам проведенного нами исследования генотипы *NAT2**A/A, *NAT2**A/G и *NAT2**G/G обнаруживаются в популяции русских в 32,48, 54,70 и 12,82 % случаев, в популяции татар – в 43,53, 44,71 и 11,76 % случаев, в популяции башкир – в 48,96, 39,58, 11,46 % случаев. Различия между тремя этническими группами по частотам аллелей статистически незначимы; частоты варьируют в пределах значений, установленных для жителей Европы. Частота аллеля *NAT2**G, важного для оценки фенотипических различий по скорости ацетилирования ЛС, составляет у русских, татар и башкир 40,17 %, 34,12, 31,25 %, соответственно. В группе русских долгожителей повышена частота генотипа *NAT2**G/G по сравнению с лицами старческого возраста (27,27 против 9,9 %, $p=0.02$) и зрелого возраста (27,7 против 12,82 %, $p=0,046$).

Следует отметить, что полиморфный участок rs1208 гена *NAT2* рекомендован в качестве фармакогенетического теста при оценке эффективности терапии ЛС, в молекулах которых есть амино- или нитрогруппа и метаболизм которых связан с реакциями ацетилирования. В частности, к прямым субстратам *NAT2* относятся: гидралазин (прямой артериальный вазодилататор), прокаинамид (антиаритмическое ЛС), сульфадiazин (антибактериальное ЛС), аминоглутетемид (противоопухолевое ЛС), изоиназид (противотуберкулезное ЛС), парааминосалициловая кислота (ПАСК – противотуберкулезное ЛС), парааминобензойная кислота (ПАБК – витамин В10), к опосредованным – нитразепам (снотворное ЛС), клоназепам (противоэпилептическое ЛС) и др.

Таким образом, на фоне роста общей заболеваемости населения важно правильно прогнозировать эффективность применения ЛС в конкретном регионе и с учётом принадлежности к определённой возрастной когорте. В данном исследовании показано, что полиморфный маркер гена *NAT2* (rs1208) ассоциирован с возрастом долгожительства у русских, жителей Республики Башкортостан. Таким образом, он может быть рекомендован в качестве потенциального фармакогенетического маркера при выборе терапии у лиц старческого возраста.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и АНА в рамках научного проекта № 19-54-40007.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЕНОМА. БИОИНФОРМАТИКА

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ У ВНЕЯДЕРНЫХ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МУТАНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

К.В. Азарин, М.С. Макаренко, А.А. Ковалевич, А.В. Усатов

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета,
344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: azkir@rambler.ru*

Хлорофильные внеядерные мутанты являются удобной моделью для изучения механизмов биогенеза хлоропластов, функционирования фотосинтетического аппарата, а также исследования ядерно-цитоплазматических взаимодействий [1]. Несмотря на широкое распространение пёстролистных растений в природе, только незначительное число мутантных фенотипов *variegated*, особенно внеядерной природы, были изучены на молекулярном уровне [2]. При этом подавляющее большинство исследований формирования и функционирования фотосинтетических мембран у Хл-дефицитных мутантов проводили на модельных видах, что ограничивает использование получаемых данных в качестве общебиологических закономерностей. В настоящей работе исследованы структурно-функциональные изменения хлоропластных геномов шести внеядерных хлорофильных химер подсолнечника, различающихся по степени дефицита хлорофилла и полученных на основе одной инбредной линии 3629.

По результатам сравнительного анализа пластидных геномов исходной зеленой линии 3629 и пёстролистных мутантов, показано, что изменения в структуре хлДНК у каждого мутанта были уникальные (табл.).

Таблица 1

**Полиморфные сайты хлоропластной ДНК у внеядерных мутантов подсолнечника
в сравнении с исходной линией 3629**

Линия	Позиция (НА383)	Тип	Замена	Локализация
<i>Var1</i>	39327	SNP	T – C	<i>psaA</i> (Gly734Glu)
<i>Var10</i>	21493	SNP	C – A	<i>rpoC2</i> (Leu768Phe)
	77663	SNP	G – A	<i>rpoA</i> (Thr203Ile)
<i>Var13</i>	43245	SNP	C – T	<i>ycf3</i> (Ala91Thr)
	43323	SNP	C – T	<i>ycf3</i> (Glu65Lys)
<i>Var15</i>	76799	SNP	C – T	<i>petD</i> (Pro72Leu)
	78894	SNP	C – T	<i>rpl36</i> (Arg35Lys)
	121402	SNP	C – T	<i>ccsA</i> (Glu259Lys)
<i>Var17</i>	19031	SNP	G – A	<i>rps4</i> (Gly29Arg)
	45975	SNP	C – T	<i>rps4</i> (Arg27Lys)
	45980	SNP	C – T	<i>rpoC1</i> (Trp672Ter) стоп кодон
<i>Var33</i>	77478	Делеция	T	<i>rpoA</i> (сдвиг рамки считывания)
	39788	Делеция	C	<i>psaA</i> (сдвиг рамки считывания)
	47912	SNP	G – T	<i>trnF</i>

В целом, в мутантной ткани пёстролистных растений с полным отсутствием хлорофиллов (белые сектора на листьях) – *Var10* и *Var17*, мутации локализованы в генах, кодирующих субъединицы пластидной РНК полимеразы. В то время как у пёстролистных форм с менее глубокими повреждениями (жёлтые сектора на листьях) – *Var1*, *Var13*, *Var15*, *Var33*, преобладают мутации, затрагивающие гены, кодирующие структурные белки фотосинтетического аппарата. Сравнительный анализ уровня экспрессии фотосинтетических генов хлоропластов в нормальных и мутантных тканях пёстролистных химер *Var 1, 10, 13, 15, 17, 33* подсолнечника выявил ряд закономерностей. Так, показано, что транскрипционная активность генов с локализованными мутациями сохраняется. Транскрипционная активность генов (*psaA*, *psbA*, *rbcL*, *petD* и др.), кодирующих субъединицы фотосистемы I и II, РБФК/О, цитохром b6/f комплекса снижается в мутантной ткани в независимости от того локализованы в них мутации или нет. При этом степень такого снижения у каждой линии специфична. Уровень экспрессии гена *ucf3*, продукт которого участвует в сборке фотосистемы I, снижается только в мутантной по этому гену линии *Var13*. Транскрипционная активность генов (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC* и *rpoC2*), кодирующих субъединицы пластидной РНК полимеразы, возрастает (исключение линия *Var13*) в мутантной ткани в независимости от того локализованы в них мутации или нет. При этом наибольшее увеличение уровня экспрессии показано в белых секторах листьев *Var10* и *Var17*, где мутации локализованы как раз в генах пластидной РНК полимеразы (*rpoA*, *rpoC1* и *rpoC2*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарин К.В., Усатов А.В., Дремук И.А. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). 2017. № 131 (07). Doi: 10.21515/1990-4665-131-040.
2. Makarenko M., Usatov A., Markin N. et al. // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2017. Vol. 13 (4). P. 18–194

Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России, проект № 6.929.2017/4.6, на оборудование ЦКП «Высокие технологии» Южного федерального университета.

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПРОГРАММ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ВРОЖДЁННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА В УСЛОВИЯХ ПЕРСИСТЕНТНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.В. Архипов, В.К. Вишниченко

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42
E-mail: vish@iab.ac.ru*

В процессе коэволюции растений-хозяев с различного рода патогенами и в отсутствие адаптивной иммунной системы растения приобрели эффективный инструмент распознавания потенциально вредоносных микроорганизмов, включая вирусы, *Pathogen-recognition system* [1, 2], в функционировании которой принимают участие приблизительно 20 % генов растения-хозяина [3–5]. Классическая “zigzag-модель” функционирования этой врожденной (innate) иммунной системы растений (ВИС) [6] и современная ее модификация, “Invasion model” [7] постулируют существование двухуровневой системы детекции патогена, а именно, РТИ (**P**attern **T**riggered **I**mmunity) и ЕТИ (**E**ffector **T**riggered **I**mmunity). На обоих уровнях распознавания патогена индуцируются сигнальные процессы, приводящие к интенсивному и скоординированному транскрипционному репрограммированию, как общих, так и специфичных в отношении РТИ и ЕТИ генов [8].

В настоящем сообщении представлены результаты исследования изменений транскрипционных программ экспрессии факторов ВИС растения-хозяина, индуцируемых (+)РНК-содержащим фитовирусом в условиях толерантной реакции растения на персистентную вирусную инфекцию (модель: X вирус шалота (ХВШ), *Allxivirus / Allium cepa L. var. aggregatum L.G. Don*). Исследованные нами элементы ВИС растения-хозяина включали: 1. Факторы **PTI** (10 классических маркеров PTI и ряд генов, продукты экспрессии которых участвуют в репродукции фитовирусов (е.с., ТСТР-комплекс); 2. Факторы **ETI**: белки **NLR_SF** (Nucleotide binding domain, **L**eucine-**R**ich superfamily); 3. Факторы **РНК-сайленсинга**, **RNA-decay** и **RQC** (RNA quality control), трех эволюционно консервативных и кооперативно функционирующих базовых групп механизмов антивирусного фитоимунитета [9]; 4. Белки **Armadillo** и **PUB** (**U**-box type **ARM**, **E3 ubiquitin ligases**); 5. Факторы **аутофагии** (е.с., **ATGs**). Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли методом ПЦР в реальном времени в формате Comparative CT Experiment; алгоритм delta-delta CT; калибратор – безвирусные сеянцы шалота; нормалайзер — 18S РНК.

Полученные результаты свидетельствуют об индукции в инфицированных растениях шалота РТИ и о транскрипционном репрограммировании факторов ETI (е.с., гомологов гена Tm2.2, кодирующего белок, принадлежащий к классу NB-LRR рецепторов). Подавленной оказалась транскрипция генов, кодирующих все факторы РНК-сайленсинга (дайсеры, аргонавты и РНК-зависимые РНК-полимеразы). Специфическим образом были изменены уровни экспрессии ряда факторов RNA-decay (элементы экзосомных комплексов RRP 40-43, декэпирующих ферментов DCP 1, 2, 5, и 5'-3'-экзорибонуклеаз XRN3 и XRN 4), а также RQC (в частности, UPF1-интерактома, ключевого фактора NMD, nonsense – mediated decay). В исследуемой патосистеме наблюдалось существенное увеличение уровня экспрессии фактора *XRN4*, участвующего в супрессии экзогенного и эндогенного РНК-сайленсинга. Таким образом, вирус не только подавляет факторы собственно РНК-сайленсинга, но и повышает активность эндогенных супрессоров этого процесса. В работе также выявлена группа генов, кодирующих различные типы белков армадилло, уровень экспрессии которых в исследуемой патосистеме оказался существенно более высоким по сравнению со здоровыми растениями. При этом наиболее высокий уровень экспрессии (увеличение на 3–4 порядка) демонстрировали белки *PUB* (U-box type ARM, E3 ubiquitin ligases), ключевые ферменты процессов убиквитинирования, участвующие, как в различных процессах аутофагии, так и в функционировании убиквитин-протеосомной системы (UPS), эффективных механизмов антивирусного иммунитета. Результаты исследования изменений транскрипционных программ экспрессии факторов аутофагии свидетельствуют о существенном увеличении уровней экспрессии транскриптов, кодирующих белки **ATG8** и **NBR1**. ATG8 участвует во всех процессах аутофагии и, в частности, – во взаимодействии R-белков с эффекторами вирусов, а **NBR1**, карго-рецептор аутофагосом, в процессе вирусной инфекции может связывать капсидные белки, вирионы и вирусные супрессоры (е.с., HC-Pro) с аутофагосомами, способствуя их последующей деградации.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что толерантная реакция растения-хозяина на персистентную вирусную инфекцию сопряжена с динамическим процессом транскрипционного репрограммирования, в результате чего наблюдаются специфические изменения экспрессии широкого спектра генов-мишеней, включая гены, кодирующие белки-маркеры PTI, NB-LRR рецепторы, факторы РНК-сайленсинга, RNA-decay и RQC, PUB (E3 убиквитин лигазы) и ряд факторов аутофагии. Эти данные позволяют рассматривать процесс транскрипционного репрограммирования в условиях персистентной фитовирусной инфекции как ключевой аспект партнерского взаимодействия (симбиоза) вируса с растением-хозяином [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Dodds P.N., Rathjen J.P. // Nat Rev Genet. 2010. Vol. 11(8). P. 539–548. Doi: 10.1038/nrg2812.
2. Noman A., Aqeel M., Lou Y. // Int. J. Mol. Sci. 2019. Apr 16. Vol. 20(8). P. E1882. Doi: 10.3390/ijms20081882.
3. Eulgem T., Somssich I.E. // Curr. Opin. Plant Biol. 2007. Vol. 10(4). P. 366–371.
4. Tsuda K., Somssich I.E. // New Phytol. 2015. Vol. 206(3). P. 932–947. Doi: 10.1111/nph.13286.
5. Birkenbihl R.P., Kracher B., Ross A. et al. // Plant J. 2018. Vol. 96(3). P. 487–502. Doi: 10.1111/tpj.14043.
6. Jones J.D.G., Dangl J. // Nature. 2006. Vol. 444. P. 323–329.

7. Cook D.E., Mesarich C.H., Thomma B.P. // Annu. Rev. Phytopathol. 2015. Vol. 53. P. 541–563. Doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120114.
 8. Birkenbihl R.P., Liu S., Somssich I.E. // Curr. Opin. Plant Biol. 2017. Vol. 38. P. 1–9. Doi:10.1016/j.pbi.2017.04.004.
 9. Li F., Wang A. // Trends Microbiol. 2019. Vol. 27(9):792-805. Doi: 10.1016/j.tim.2019.05.007.
 10. Roossinck M.J., Bazán E.R. // Annu Rev. Virol. 2017. Vol. 29. № 4(1). P. 123–139. Doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042323.
-

ПАЛЕОГЕНОМИКА И ДОМСТИКАЦИЯ

Д.В. Богуславский^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт пушиного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, 140143, Российская Федерация, Московская обл., Раменский р-н, пос. Родники, ул. Трудовая, 6

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: boguslavsky@rambler.ru

Палеогеномика – анализ древней ДНК, полученной из палеонтологических останков. Совершенствование методов получения и анализа структуры образцов ДНК к 80-м годам XX в. позволило проводить молекулярно-генетические исследования материалов, полученных от ископаемых останков различного возраста. Первая древняя ДНК возрастом около 140 лет была выделена в 1984 г. из вымершего непарнокопытного квагги [1], а уже в 1985 г. появились первые результаты анализа ДНК из древних останков человека – египетской мумии возрастом около 2 400 лет [2]. Появление во второй половине 1980-х годов полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило получать неограниченное число копий целевого фрагмента ДНК даже при его чрезвычайно низкой концентрации. Древнюю ДНК стали выделять из ископаемых останков разных организмов возраста от сотен до десятков тысяч лет [3, 4]. Новый этап в развитии палеогеномики связан с внедрением в начале нового тысячелетия методов высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК, благодаря которым появилась возможность получать большой объём генетической информации из меньшего объёма материала, содержащего ДНК.

За последние 30 лет был проведён анализ генетической истории всех основных культурных растений и домашних животных. Были предложены модели хронологии и биогеографии их одомашнивания и последующего разведения, вначале по данным митохондриальной, а затем и геномной ДНК. Палеогеномные технологии меняют наше понимание доместикиции, поскольку дают нам геохронологическую привязку («ось времени»).

Возможно самое впечатляющее исследование в этой области было проведено на лошадях [5]. Самое раннее археологическое свидетельство одомашнивания лошади найдено в Прикаспийской степи Казахстана с энеолитической культурой ботаев, насчитывающей около 5500 лет. Было секвенировано 42 древних конских генома и найдены доказательства множественного одомашнивания лошади и неожиданной ферализации лошади Пржевальского. Сравнили геномы из 20 образцов лошадей из Казахстана с геномами 22 образцов лошадей, выкопанных из других мест в Европе и Центральной Азии, охватывающих последние 5000 лет. Также сравнили эти древние геномы с ранее опубликованными древними и современными геномами лошадей, а также геном лошади Пржевальского XIX века. Оказалось, что лошадь Пржевальского – дикая популяция, произошедшая от лошадей, которые были первыми одомашнены в Прикаспии. Современные домашние лошади, скорее всего, возникли в результате последующего эпизода одомашнивания, произошедшего где-то 4000 лет назад, из другой линии уже вымерших диких лошадей.

За эти 4000 лет происходило многократное скрещивание с дикими популяциями, что достоверно улучшало жизнеспособность домашних популяций, увеличивая их генетическое разнообразие и

приспособленность к новым условиям существования. Таким образом, палеогеномика лошадей показывает, что одомашнивание животных есть сложный процесс, характеризующийся ферализацией, а также скрещиванием между дикими и одомашненными особями. Палеогеномика также выявила существование архаичных линий вымерших ныне популяций лошадей, которые остались бы неизвестными, если бы проводили только геномные исследования живых лошадей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Higuchi R., Bowman B., Freiburger M. et al. // Nature. 1984. Vol. 312. P. 282–284. DOI: 10.1038/312282a0.
2. Pääbo S. // Nature. 1985. Vol. 314 (6012). P. 644–645. PMID: 3990798
3. Thomas R.H., Schaffner W., Wilson A.C., Pääbo S. // Nature. 1989. Vol. 340 (6233). P. 465–467. PMID: 2755507.
4. Golenberg E.M., Giannasi D.E., Clegg M.T. et al. // Nature. 1990. Vol. 344 (6267). P. 656–658. PMID: 2325772
5. Gauntz C., Fages A., Hanghøj K. et al. // Science. 2018. Vol. 360 (6384). P. 111–114. Epub 2018 Feb 22. PMID: 29472442 DOI: 10.1126/science.aao3297.

ИЗУЧЕНИЕ УЧАСТКОВ ГЕНОМА В ОКРЕСТНОСТИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ПРЕЭКЛАМПСИИ

О.Ю. Бордаева

Перинатальный центр, 344068, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, 90
E-mail: bordaeva@mail.ru

Преэклампсия (ПЭ) является распространённым заболеванием, характеризующимся гипертонией и протеинурией, которое встречается приблизительно в 5–8 % беременностей во всем мире [1]. Накопленные данные показали, что большое количество генов способствует возникновению и развитию ПЭ.

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК, состоящие примерно из 19–23 нуклеотидов, которые могут связываться с 3'-нетранслируемой областью таргетных мРНК, тем самым ингибируя их трансляцию и регулируя экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Например, повышенная экспрессия miR-210 в плаценте ассоциирована с патогенезом ПЭ [2], а miR-1233 считается потенциальным биомаркером ранней ПЭ [3]. Гены микроРНК могут быть локализованы как в интронах и экзонах генов, так и в геномном окружении. Работа генома тесно связана с его организацией, поэтому целью нашего исследования было провести биоинформационный анализ и выявить закономерности локализации микроРНК в окрестностях генов, ассоциированных с развитием преэклампсии.

Объектом исследования служили нуклеотидные последовательности в окрестности следующих генов: *F2, F5, F7, F13A1, FGB, ITGA2, ITGB3, SERPINE1, MTHFR, MTR, MTRR, ADD1, AGT, AGTR1, AGTR2, CYP11B2, GNB3, NOS3, GSTP1, HIF1A, IL10, IL1B, IL6, PPARGC1A, SOD2, TNF*. Под окрестностью гена понимаются участки, включающие последовательность самого гена и фланкирующие его участки ДНК длиной 5 0000 п.н. Нуклеотидные последовательности были получены из баз данных NCBI и miRBase (выпуск 22.1) посредством E-utilities API. Поиск мотивов осуществлялся с помощью биоинформационного пакета MEME Suite. Учитывались мотивы со степенью гомологии 85 % и выше.

Общее число мотивов, гомологичных последовательностям зрелых микроРНК, в окрестностях исследованных участков генома составило 371, в том числе мотивов перед геном – 106; внутри – 189; после – 76. Наибольшее количество мотивов наблюдалось в окрестностях гена *PPARGC1A* (60), участвующего в дифференцировке клеток, в метаболизме мышечных тканей, в обмене жиров и углеводов. Наибольшая плотность мотивов была выявлена в окрестностях гена *GNB3* (407 шт./млн. п.н.), связанного с изменением дифференцировки лимфоцитов и фибробластов, пролиферативной активности, передачи сигналов внутрь клетки. Самыми распространёнными мотивами были

гомологичные микроРНК miR-619-5p и miR-5585-3p, которые, очевидно, являются координаторами экспрессии генов, участвующих во многих основных биологических процессах [4–6]. Единственным мотивом в окрестности гена *AGT*, кодирующего белок ангиотензиноген, был мотив, гомологичный микроРНК miR-6777-3p, расположенный внутри гена и перекрывающийся с интроном. Таким образом, установлено, что количество мотивов и плотность их распределения в окрестностях генов, ассоциированных с развитием преэклампсии, варьирует от гена к гену. Полученные результаты будут использованы для поиска новых биомаркеров для диагностики и терапии преэклампсии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duley L. // SEMIN PERINATOL. 2009. Vol. 33 (3). P. 130–137. Doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010.
2. Nikuei P., Davoodian N., Tahamtan I., Keshtkar A.A. // BMJ OPEN. 2016. Vol. 6 (9). P. e11920.
3. Ura B., Feriotto G., Monasta L. et al. // Taiwan J. Obstet. Gynecol. 2014. Vol. 53 (2). P. 232–234. Doi: 10.1016/j.tjog.2014.03.001.
4. Shkurat T.P., Derevyanchuk E.G., Rebrova G.N. et al. // Annals Academy of Medicine Singapore. 2016. Vol. 45 (suppl) (9). P. 172.
5. Shkurat T.P., Romanov D.E., Pshenichnyij E.A. et al. // American Journal of Applied Sciences. 2015. № 1 (12). P. 1–7.
6. Derevyanchuk E.G., Romanov D.E., Demakova N. et al. // The Non-Coding Genome, EMBL Heidelberg, Germany, 18–21 October 2015. P. 142.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА Y-ХРОМОСОМЕ ЧЕЛОВЕКА

В.А. Грабарь

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: wasile.grabar@gmail.com*

В настоящее время хорошо изучены процессы регуляции сперматогенеза у многих видов, выделены гены, отвечающие за процесс формирования сперматозоидов. Несмотря на огромное научное значение работ по секвенированию, они не дали полной картины регуляции процессов определения пола и сперматогенеза. На данном этапе, в частности, не ясны функции и молекулярные механизмы действия некодирующих белок элементов, но в исследованиях последних лет была показана роль многих классов некодирующих генов как *цис*-регуляторных элементов генома.

Целью исследования было изучение различных типов некодирующих элементов, локализованных в Y-хромосоме человека. Задачи исследования включали в себя бионформационный анализ последовательности с использованием баз данных NCBI, ENSEMBL, ENCODE.

Материалом для биоинформационного анализа послужила полная нуклеотидная последовательность Y-хромосомы человека, полученная из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Биоинформационный анализ последовательности был произведён с помощью программного пакета DotPlot, разработанного специалистами кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии ЮФУ [1]. Поиск последовательностей проводился для шести типов некодирующих белок элементов (микроРНК, прекурсоромикроРНК, Alu-элементов, промоторов, псевдогенов, длинных некодирующих РНК). Для оценки распределения плотности обнаруженных некодирующих элементов по Y-хромосоме из всего массива данных отсеивались уникальные образцы, т. е. при наличии в последовательности участка, занимающего одну позицию на хромосоме, но гомологичного сразу нескольким элементам из базы, учитывалась только одна позиция.

Результаты исследования показали, что генетическое разнообразие функциональных элементов в регионе PAR1 намного больше, чем в других участках Y-хромосомы. Практически все функциональные

элементы в некодирующей ДНК располагаются с одинаковой частотой на прямой и обратной цепи ДНК. Исключение составляют прекурсоры – они в 81,82 % локализованы на прямой цепи и в 18,18 % локализованы на обратной. Плотность Alu на Y-хромосоме составила в среднем 112,5 на 1 млн. п.н., что в два раза меньше чем на других хромосомах человека. В среднем этот показатель по геному составляет около 265 на 1 млн. п.н. Плотность длинных некодирующих РНК составляет 85 на 1 млн. п.н.

Согласно ряду исследований, характер распределения различных функциональных элементов генома влияет на организацию трёхмерной структуры генома, в частности, на форму и расположение хромосомных территорий [2–5]. Что, в свою очередь, влияет на экспрессию генов, расположенных на различных участках хромосомы, и взаимодействие между продуктами генов. Уникальные особенности Y-хромосомы, такие, как её совершенно различные структурно-регионы PAR и NRY, а также различные типы повторов «внутри» NRY-региона, позволяют глубже изучить трёхмерную организацию генома. Дальнейшие исследования некодирующих элементов и молекулярно-генетических механизмов, связанных с ними, могут быть использованы при разработке новых методов диагностики и лечения мужского бесплодия, которое становится всё более распространённым во всём мире расстройством.

ЛИТЕРАТУРА

1. Романов Д.Е., Ксенз Н.С. Mscanner: Программа для автоматического поиска мотивов в последовательностях ДНК. Свидетельство о регистрации № 2016661028; заявл. 18.10.2016; опубл. 25.11.2016.
2. Stam M., Tark-Dame M., Fransz P. // Curr. Opin. Plant Biol. 2019. Vol. 48. P. 36–46.
3. Sehgal N., Fritz A.J., Morris K. et al. // Chromosoma. 2014. Vol. 123 (5). P. 499–513.
4. Küpper K., Kölbl A., Biener D. et al. // Chromosoma. 2007. Vol. 116 (3). P. 285–306.
5. Vergés L., Blanco J., Valero O., Vidal F., Sarrate Z. // FertilSteril. 2014. Vol. 101 (3). P. 818–824.

СРАВНЕНИЕ КОНСЕРВАТИВНОСТИ CDK2 И BRCA1: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Т.М. Гришаева, С.Н. Матвеевский

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3
E-mail: grishaeva@vigg.ru; sergey8585@mail.ru

В митозе и мейозе активны сотни белков. Часть из них является структурными (когезины, конденсины, гистоны, белки синаптонемного комплекса и пр.), другая часть обладает ферментативной активностью. Среди последних есть белки, специфичные для мейоза, и универсальные. Они участвуют в десятках клеточных процессов. К таким ферментам относятся CDK2 (циклин-зависимая киназа) и BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein, он же E3 убиквитин-протеин лигаза). Консервативность ферментов различна. Часть ферментов была исследована нами ранее [1]. В данной работе мы поставили задачу сравнить консервативность CDK2 и BRCA1 с помощью комплекса методов биоинформатики и проверить полученные данные в ходе цитогенетических исследований.

Были изучены ортологи CDK2 у пяти модельных видов позвоночных животных (человека *Homo sapiens* (Hs, CDK2_HUMAN), мышцы *Mus musculus* (Mm, CDK2_MOUSE, isoform alpha), рыбы *Danio rerio* (Dr, NP_998571), птицы *Gallus gallus* (Gg, NP_001186786) и ящерицы *Anolis carolinensis* (Ac, предсказанный белок XP_008112629)); двух видов беспозвоночных животных (нематоды *Caenorhabditis elegans* (Ce, CDK2_CAEEL) и насекомого *Drosophila melanogaster* (Dm, NP_732544)); растения *Arabidopsis thaliana* (At, NP_566911) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, NP_009718). Частично проанализирован также белок дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (Sp, NP_595629), присутствующий

в базе данных GeneCards, но удалённый из базы данных NCBI. В случае BRCA1 в анализ были взяты ортологи у пяти видов позвоночных животных (человека *Homo sapiens* (Hs, BRCA1_HUMAN), мыши *Mus musculus* (Mm, BRCA1_MOUSE), амфибии *Xenopus laevis* (Xl, AAL13037.1), птицы *Gallus gallus* (Gg, NP_989500.1) и ящерицы *Anolis carolinensis* (Ac, предсказанный белок XP_008111382.1)), а также у растения *Arabidopsis thaliana* (At, BRCA1_ARATH). По последнему белку сведения в базах данных были противоречивыми. У беспозвоночных животных (нематоды Ce и насекомого Dm), у дрожжей Sc и Sp, а также у рыбы Dr ортологов этого белка нет (базы данных GeneCards и NCBI).

Доменную организацию белков определяли с помощью программы CDART. CDK2 имеет небольшие размеры (297–368 а.к.) и целиком состоит из одного функционального домена – STKc_CDK2_3 (серин-треонин киназа, циклинзависимая киназа 2 и 3 из суперсемейства PKc_like). Имеется также много сайтов связывания с другими белками и АТФ. Гораздо больший по размеру (941–1863 а.к.) белок BRCA1 у животных несёт домены только в N- и C-концевых фрагментах. Кроме того, в молекулах этого белка также присутствует множество активных сайтов связывания с другими белками и цинком, и они тоже сосредоточены на концах молекулы. У арабидопсиса набор доменов отличается, что подтверждает сведения из GeneCards об отсутствии у этого растения ортолога BRCA1. Более детальный анализ первичной структуры белков (выявление консервативных аминокислотных мотивов) проводили с помощью программы MEME. Набор мотивов идентичен у позвоночных, один мотив отсутствует у дрозофилы и арабидопсиса, два мотива – у нематоды и дрожжей Sc. Молекулы BRCA1 идентичны по набору мотивов у мыши и человека и имеют несколько общих мотивов на концах молекулы с BRCA1 других позвоночных. Белок арабидопсиса имеет мало общего с другими ортологами.

Вторичная структура CDK2 (программа COILS) отсутствует у всех изученных видов. В молекуле BRCA1 животных есть один фрагмент альфа-спирали во второй половине молекулы и несколько меньших фрагментов, отличных у разных видов. У арабидопсиса вторичная структура не выражена. Была изучена также изоэлектрическая точка белков (pI).

Таким образом, CDK2 очень консервативна, по крайней мере, в пределах подтипа позвоночных. Это даёт возможность применять коммерческие антитела для исследований на широком круге объектов. Этот вывод был подтверждён благодаря иммуноцитохимическому анализу распределения белков в мейотических хромосомах. С помощью мышинных моноклональных антител, выработанных против CDK2 человека (SantaCruz, sc-6248, разведение 1:250), были успешно иммуноокрашены препараты мейотических хромосом лабораторной крысы *Rattus norvegicus* линии Dark Agouti и обыкновенной слепушонки *Ellobius talpinus*. В пахитенных хромосомах были выявлены три CDK2-сигнала: два в теломерных участках и один интерстициальный. BRCA1 менее консервативен. Для широких цитогенетических исследований можно рекомендовать антитела, выработанные против N- или C-концевых частей молекулы. В наших исследованиях (СМ) препараты мейотических хромосом обыкновенной слепушонки *E. talpinus* были успешно окрашены козыми антителами к BRCA1 мыши (SantaCruz, sc-1553, разведение 1:50). Сигналы BRCA1 были идентифицированы в половом биваленте в пахитенных сперматоцитах.

ЛИТЕАТУРА

1. Grishaeva T.M., Bogdanov Y.F. // The Nucleus. 2018. Vol. 61. № 3. P. 175–182.

Исследование выполнено при финансовой поддержке бюджетного финансирования Государственного задания ФГБУ Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по теме № 0112-2019-0002

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ СИСТЕМ В КУЛЬТУРАХ НЕЙРОНОВ ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИПСК

Э.Б. Даширмаев, К.К. Сухинич, В.Е. Дьяконова, Д.В. Богуславский, И.С. Захаров

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: boguslavsky@rambler.ru

Терапия нервными клетками, полученными из дедифференцированных клеток человека, является одним из перспективных подходов в области регенеративной неврологии. Целью исследования было изучение разнообразия нейротрансмиттеров в развивающихся культурах человеческих нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) *in vitro*. Клеточная линия IPSC-KYOU-DXR0109B была приобретена в банке клеток АТСС. Используя DUAL SMAD ингибирование, были получены стволовые клетки, которые затем дифференцировались в нейроны. Для наблюдения сигналов возбуждения нейронов с помощью системы трансгеноза «Sleeping Beauty» была получена линия трансгенных клеток ИПС с конститутивной экспрессией флуоресцентного индикатора кальция GCaMP6s. Используя данные транскриптомного анализа, проведенного на культурах нейронов человека, полученных направленной дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, была проанализирована экспрессия генов, связанных с функционированием основных нейротрансмиттерных и нейромодуляторных систем мозга человека. Всего было получено восемь различных культур нейронов, от разных, генетически не связанных доноров. При помощи высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) на приборе Illumina HiSeq4000 был сделан анализ транскриптома (RNA-seq) каждой культуры (парноконцевые прочтения x 150 п.о, 75-100 млн прочтений на один образец). В результате были оценены уровни экспрессии генов ферментов синтеза и мишеней (рецепторов) следующих сигнальных молекул: глутамат, ГАМК, глицин, ацетилхолин, серотонин, дофамин, оксид азота. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гены всех исследованных нейротрансмиттерных систем экспрессируются в культурах. Этот результат согласуется с предположением о раннем формировании мультитрансмиттерности как основополагающей характеристике функционального нейронального ансамбля.

Были выявлены и существенные различия в уровне экспрессии разных систем. Наибольшее число транскриптов ферментов синтеза обнаружено для глутамата, ГАМК и оксида азота. Несколько ниже экспрессия генов ацетилхолиновой и глициновой систем, и на порядок – два ниже по уровню экспрессии гены серотониновой и дофаминовой систем. Преобладание глутаматно-гамкэргической сигнализации характерно для мозга млекопитающих. Уровень экспрессии ферментов синтеза всегда ниже уровня экспрессии мишеней (рецепторов или других белков, взаимодействующих с нейротрансмиттером). Однако при более низкой экспрессии генов фермента синтеза ниже оказывается и экспрессия рецепторов к этому нейротрансмиттеру. Это соответствие предполагает неслучайный характер. По-видимому, оно отражает степень развития единой нейротрансмиттерной системы.

Полученные данные подтверждают наличие различных нейротрансмиттерных фенотипов в нейронах, дифференцированных от клеточной линии IPSC-KYOU-DXR0109B. Значение исследований клеточных культур из ИПС клеток человека может помочь в разработке моделей различных заболеваний и дать полезный инструмент для скрининга лекарственных препаратов. С другой стороны, исследования в культуре развивающихся нейронов дают понимание механизмов формирования фенотипических свойств нейрона в естественных условиях, поскольку этот процесс зависит от актуальной гетерохимической межклеточной среды (ниши), в которой оказываются клетки-предшественники. На основании наших экспериментов возможно будет проведение подбора различных комбинаций нейротрансмиттеров в культуральной среде, позволяющих управлять тонкой дифференцировкой нейронов из одного типа в другой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума Российской академии наук, программа № 42 «Фундаментальные исследования для развития медицинских технологий», Государственная программа фундаментальных исследований, № 0108-2018-00015.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНА H3K4 В МЕХАНИЗМАХ ПАМЯТИ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Т.Г. Зачецило, Н.Г. Лопатина

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

E-mail: polosataya2@mail.ru

Известно, что формирование памяти сопровождается активацией экспрессии генов и ремоделированием хроматина. Последнее зависит от эпигенетических модификаций ДНК и гистонов. Метилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4me) ассоциировано с активацией транскрипции и локализовано в промоторной части гена. Процесс метилирования осуществляют ферменты – гистоновые метилтрансферазы (HMT). H3K4me активно исследуется в ЦНС животных.

Работа выполнена на медоносной пчеле – уникальном модельном объекте для изучения молекулярных механизмов памяти. Использованы методы: условно-рефлекторный, иммуногистохимический и ОТ-ПЦР. Пчел обучали, далее извлекали мозг, фиксировали, готовили срезы, окрашивали с антителами к H3K4me / гомогенизировали, выделяли РНК, проводили ОТ-ПЦР с праймерами к HMT.

Показано, что у медоносной пчелы в процесс формирования ольфакторной ассоциативной памяти вовлекается H3K4me. В нейронах калликсов грибовидных тел – структур, отвечающих за обучение и память у насекомых: 1) увеличивается число имморекативных нейронов; 2) повышается экспрессия генов гистоновых H3K4me метилтрансфераз и деметилаз. Полученные данные вносят вклад в понимание эпигенетических механизмов памяти.

ИММУНОЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХРОМОСОМ В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА У ГЛАДКОЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

С.Н. Матвеевский¹, С.Д. Столяров², О.Л. Коломиец¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Губкина, 3

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской Академии наук, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: sergey8585@mail.ru

Гладкая шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* (Pipidae, Anura, Amphibia) – модельный объект клеточной и эволюционной биологии. В кариотипе этого вида 36 мета-, субмета- и субтелоцентрических хромосом [1]. *X. laevis* – вид, эволюция которого сопровождалась древней полиплоидизацией и который представляет собой палеотетраплоид ($4x=2n=36$), состоящий из двух наборов 18 хромосом или из 9 хромосомных квартетов [2]. Каждый квартет включает две гомеологичные пары гомологичных хромосом.

Иммуноцитологическое исследование мейоза у этого вида весьма актуально, поскольку детали структуры и поведения мейотических хромосом в профазе I позволяют судить о характере синapsиса хромосом, представленного квартетами. В настоящем сообщении впервые представлены результаты иммуноцитологического анализа поведения хромосом в профазе I мейоза на основе анализа скелетных нуклеопротеидных структур мейотического бивалента – синаптонемных комплексов (СК).

На стадии зиготены частично синаптированные хромосомы образуют классическую фигуру «букета»: их теломерные концы группируются вблизи одного из полюсов ядра (рис. а). В пахитене хромосомы полностью синаптированы. Все 18 СК-бивалентов гораздо длиннее хромосом большинства млекопитающих. Самый длинный СК-бивалент составлял 64 μm , что в среднем в 8–10 раз длиннее, чем пахитенные хромосомы у грызуна – обыкновенной слепушонки. В распластанном мейотическом ядре СК часто переплетаются (рис. б). Иммунодетекция белков кинетохоров позволила установить, что часть бивалентов имеет несоориентированные центромеры, что было отмечено ранее [3]. В диплотене хромосомы десинаптируют: видны участки десинапсиса и последовательная SYCP3-фрагментация осевых элементов (рис. в).

Иммуносигналы маркерного белка репарации двуниевых разрывов (DSBs) ДНК-Rad51 распределены по всему мейотическому ядру с большим количеством в области прикрепления теломерных участков хромосом на стадии зиготены. В ранней пахитене количество Rad51-сигналов значительно уменьшается, и они детектированы в пределах СК (3–6 сигналов на СК-бивалент). В средней пахитене наблюдаются единичные сигналы, а в диплотене репарация DSBs ДНК завершается.

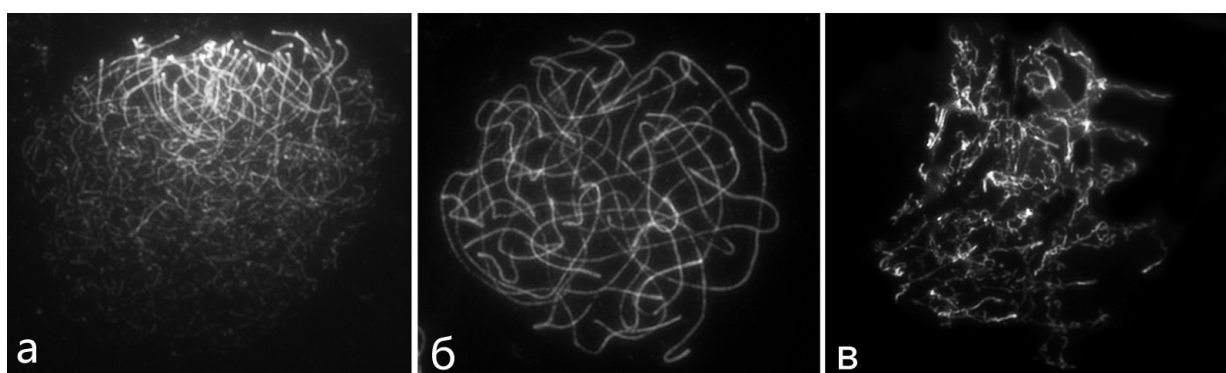


Рис. Сперматоциты *Xenopus laevis* на разных стадиях профазы I: а – зиготена, хромосомный букет; б – пахитена; в – диплотена. Белый сигнал соответствует распределению основного белка СК – SYCP3. Ув. $\times 1000$.

Наши данные подтверждают результаты электронно-микроскопического исследования СК [3]. Установлено, что хромосомы гомеологических пар не вступают в синапсис друг с другом. Вероятно, с момента возникновения тетраплоидного кариотипа *X. laevis* прошло достаточное количество времени для того, чтобы гомеологи накопили различия и не вступали в гомеологичный синапсис. В противном случае должны были формироваться мультивалентные конфигурации. Последние данные литературы свидетельствуют о том, что аллотетраплоидный кариотип был сформирован около 17–18 млн лет назад [4]. Дискоориентация центромер в СК-бивалентах, как утверждается в работе [3], возможно связана с тем, что в лабораторной гибридизации могут использоваться разные подвиды, у которых положение центромеры может не на много отличаться.

Таким образом, иммуноцитохимически мы идентифицировали все стадии профазы I мейоза, проследили динамику основных белков, участвующих в синапсисе и репарации DSBs ДНК. В дальнейшем будут проведены дополнительные исследования СК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmid M., Steinlein C. // Cytogenetic and Genome research. 2015. Vol. 145. № 3–4. P. 201–217.
2. Matsuda Y., Uno Y., Kondo M. et al. // Cytogenetic and Genome research. 2015. Vol. 145, № 3–4. P. 187–191.
3. Loidl J., Schweizer D. // The Journal of Heredity. 1992. Vol. 83, № 4. P. 307–309.
4. Session A.M., Uno Y., Kwon T. et al. // Nature. 2016. Vol. 538, № 7625. P. 336.

ГЕНОМНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ РАЗМЕРА ТЕЛА И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Д.Е. Романов, Г.Б. Бахтадзе

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: rdme@ya.ru

Ранее нами была показана значимая корреляция между размером тела и продолжительностью жизни, а также геномным расстоянием между некоторыми парами консервативных элементов генома в окрестностях регулирующих рост генов *Mycn*, *Plagl1* и *Ezh2*, причем для наиболее скоррелированных пар элементов один элемент из пары перекрывался с промотором соответствующего гена, а зависимость имела экспоненциальный характер [1–3].

Представленность в геноме последовательностей, гомологичных последовательностям этих консервативных элементов, может отражать их функциональную значимость.

Был осуществлён поиск гомологов данных последовательностей по геному человека с помощью веб-сервиса *Ensembl BLAST*. Показано, что один из элементов каждой из пар представлен лишь в одной копии в геноме, в то время как второй элемент пары — многими копиями.

Таким образом, последовательности первых элементов можно рассматривать как уникальные, геноспецифичные регуляторные участки, в то время как последовательности вторых элементов из пары могут быть отнесены к классу универсальных регуляторных последовательностей, способных контролировать любые соседние гены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Romanov D.E., Butenko E.V., Shkurat T.P. // Gene Reports. 2019. Vol. 14. P. 124–128.
2. Романов Д.Е. // XXV Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2018». М.: МГУ, 2018. С. 4.
3. Романов Д.Е., Шкурят Т.П. // Мат-лы науч.-практ. конф. с междунар. участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2017. С. 102–103.

Исследование выполнено в рамках госзадания МОН РФ, проект No 6.6762.2017 БЧ.

ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ *Chelidonium majus* L.

*Т.Е. Саматадзе¹, Ф.М. Хазиева², О.Ю. Юркевич¹, А.И. Морозов¹, А.В. Амосова¹,
О.В. Муравенко¹*

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Российская Федерация, г. Москва,

²Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, 117216, Российская Федерация, г. Москва, ул. Грина, 7, стр. 1

E-mail: tsamatadze@gmail.com; vilar.6@yandex.ru

Особое место среди огромного видового разнообразия покрытосеменных растений занимают лекарственные растения, которые встречаются повсеместно и используются человеком издавна. Широко распространенным и востребованным растением является чистотел большой *Chelidonium majus* L. – лекарственное растение семейства Маковых (Papaveraceae). Интерес к чистотелу в последнее время значительно возрос и связано это с противоопухолевым потенциалом различных алкалоидов *C. majus*, входящих в его состав [1].

Целью работы стало изучение внутривидового морфологического и хромосомного полиморфизма в кариотипах двух форм чистотела: обычной и махровой.

Материалом для исследования послужили растения, соцветия и семена *C. majus*, собранные в 2018–2019 гг. Определение характера и уровня изменчивости растений проводилось по морфологическим признакам. Предобработку корневых меристем интеркалятором ДНК - 9 аминокридином, приготовление хромосомных препаратов, анализ мейоза, DAPI-бэндинги FISH-анализ проводили согласно описанным ранее методикам [2].

Установлено, что у махровой формы соцветия были значительно крупнее, количество лепестков в венчиках было более четырёх и этот показатель достоверно отличался от обычной формы чистотела. Анализ мейоза показал, что изучаемые формы чистотела в метафазе I содержали 6 бивалентов (6^{II}). Наряду с нормальным течением мейоза, в метафазе-I (M-I) были обнаружены хромосомные ассоциации: триваленты, квадриваленты, а также выявлены униваленты, которые находились за пределами метафазной пластинки, сбоку от нее или у полюсов микроспороцита. Суммарный процент микроспороцитов с нарушениями в метафазе I и анафазе I у растений как махровой формы, так и у чистотела из различных мест произрастания составлял в среднем от 2,05 до 2,17 % и не выходил за рамки видового полиморфизма.

Морфометрический анализ хромосом позволил установить, что исследуемый вид имеет в кариотипе шесть пар мелких хромосом ($2n=12$) размером 1,7–3,0 мкм. Кариотип представлен, в основном, субметацентрическими хромосомами с наличием трёх пар спутничных хромосом (1,4 и 6). Рисунок C/DAPI-окрашивания специфичен для каждой хромосомы (рис.). Анализ рисунков распределения C/DAPI-бэндов по длине хромосом показал, что в их кариотипах более крупные гетерохроматические блоки расположены в прицентромерных районах хромосом, а средние и небольшие C/DAPI -бэнды – преимущественно в теломерных и интеркалярных районах.

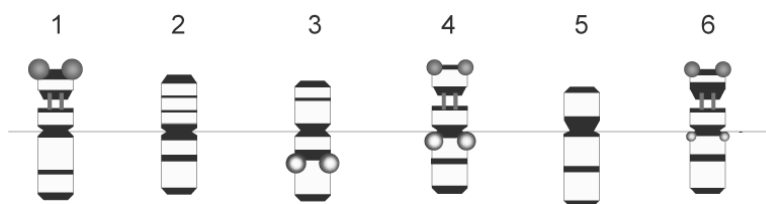


Рис. Обобщённая идиограмма хромосом *C. majus*. Бэнды, окрашенные в черный цвет – C/DAPI-гетерохроматин; в серый цвет – локализация 45SpДНК; в светло-серый цвет – локализация 5SpДНК.

По данным FISH анализа, у чистотела сайты 45SpДНК локализованы на трёх спутничных хромосомах 1,4 и 6 (рис.). Спутничные хромосомы имели вторичную перетяжку в прицентромерном районе и сходный рисунок C/DAPI-окраски. Крупные локусы 5SpДНКс сигналом высокой интенсивности выявлены в длинных плечах на 3-й хромосоме и на 4-й спутничной хромосоме. У махровой формы чистотела наблюдается полиморфизм по наличию минорного сайта 5SpДНК на 6-й спутничной хромосоме в районе длинного плеча. Других изменений на хромосомах кариотипов у форм чистотела не выявлено.

Таким образом, результаты исследования данных морфологического и молекулярно-цитогенетического анализа различных форм *C. majus* позволили выявить особенности их морфологического видового состава, а также охарактеризовать их геномы. Установлена хромосомная стабильность у обеих форм чистотела, что является положительным признаком для включения этого вида в качестве генетических ресурсов в селекционные программы, а в дальнейшем позволит расширить сырьевую базу для получения новых доступных современных фитопрепаратов, ингибирующих рост злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Maji A.K., Banerji P.* // International Journal of Herbal Medicine. 2015. № 3. P. 10–27.
2. *Samatadze T.E., Zoshchuk S.A., Haziya F.M. et al.* // Scientific Reports. 2019. № 9. P. 1–11.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-016-00167.

АНАЛИЗ МЕЙОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В КОНТЕКСТЕ ПОЛИПЛОИДНОЙ ЭВОЛЮЦИИ

**С.А. Симановский¹, С.Н. Матвеевский², Е.И. Рачек³, Д.Ю. Амвросов³, В.А. Трифонов⁴,
Н.С. Мюге⁵, Е.Д. Васильева⁶, В.П. Васильев¹**

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский пр., 33, E-mail: sergeysimanovsky@gmail.com; vasvik1943@gmail.com

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Губкина, 3, E-mail: sergey8585@mail.ru

³ФГУП ТИПРО-Центр, Владивосток, 690950, Российская Федерация, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4, E-mail: evgenyi.rachek@tinro-center.ru; d.amvrosov@yandex.ru

⁴Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8/2, E-mail: vlad@mcb.nsc.ru

⁵Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, 107140, Российская Федерация, г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17, E-mail: tiguie@mail.ru

⁶Зоологический музей Московского государственного университета, 125009, Российская Федерация, г. Москва, ул. Большая Никитская, 2, E-mail: vas_katerina@mail.ru

Семейство осетровых (Acipenseridae) включает три рода – *Acipenser* (вместе с *Huso*), *Scaphirhynchus* и *Pseudoscaphirhynchus*, представленных 25 видами. Начало их эволюции восходит к триасу (245–208 млн. лет назад). За этот период осетровые прошли несколько разобщённых во времени актов полиплоидизации, в результате чего возникли три группы видов с разными уровнями пloidности: диплоидные ($2n \sim 120$ хромосом), тетраплоидные ($2n = 250–270$) и один гексаплоидный вид ($2n \sim 372$). Однако ряд данных даёт основание полагать, что 120-хромосомные виды имеют тетраплоидное происхождение (см. Vasil'ev, 2009). Показано, что стерлядь *Acipenser ruthenus* ($2n=120$) является сегментным тетраплоидом. В связи с этим было предложено использовать две шкалы уровней пloidности осетровых: современная шкала ($2n - 4n - 6n$) и эволюционная шкала ($4n - 8n - 12n$).

Ряд многохромосомных видов ($2n = 250–270$) имеет независимое происхождение благодаря параллельным актам полиплоидизации в двух филетических кладах: атлантической и тихоокеанской. Из многохромосомных видов фауны России атлантической кладе принадлежат сибирский *A. baerii*, русский *A. gueldenstaedtii*, персидский *A. persicus*, а тихоокеанской – калуга *A. dauricus*, амурский *A. schrenckii* и сахалинский *A. mikadoi* осетры. Большой интерес представляет выяснение процессов структурной и функциональной диплоидизации геномов полиплоидных видов, которая всегда имеет место после полиплоидизации. У осетровых скорость диплоидизации крайне низкая, что находится в соответствии со скоростью их молекулярной эволюции. Время дивергенции атлантической и тихоокеанской клад, согласно методу молекулярных часов, составляет 125 млн. лет.

Одно из важных направлений исследований в осетроводстве – межвидовая гибридизация с целью поиска гибридов с хозяйственно ценными признаками. Известно, что результаты межвидовой гибридизации осетровых зависят от кариотипов родительских видов: виды с одинаковым уровнем пloidности обычно дают нормальных фертильных гибридов (например, бестер); размножение гибридов от видов с разным уровнем пloidности невозможно в силу стерильности или обоих полов,

или стерильности самок. Однако иногда самцы таких гибридов могут быть частично фертильными, что было показано для гибридных самцов стерляди и калуги.

В данном сообщении приводятся результаты изучения синаптонемных комплексов (СК) у ряда видов осетровых и их гибридов. СК – это ядерный белковый скелет, который формируется между двумя гомологичными хромосомами в профазе I мейоза. СК были исследованы иммуноцитохимическим (с использованием поликлональных кроличьих антител к основному белку СК – SYCP3 фирмы Abcam) или электронно-микроскопическим методом после окрашивания раствором нитрата серебра.

С помощью иммуноцитохимического анализа у стерляди на стадии пахитены (полное спаривание хромосом) было обнаружено ~60 бивалентов, что соответствует $2n = 118 \pm 2$. Однако на более ранних стадиях профазы I (зиготена) были выявлены триваленты. Наличие мультивалентов, корректирующихся к пахитене, может служить доказательством палеотетраплоидной природы генома стерляди, который прошёл долгий путь редиплоидизации, но сохранил ортологичные регионы в различных парах хромосом, как это было показано с помощью методов цитогеномики. У сибирского осетра реки Лена в пахитенных сперматоцитах формируются ~125 бивалентов, что соответствует кариотипу $2n = 249 \pm 5$. Биваленты были полностью синаптированы, за исключением нескольких микрохромосом. У калуги ($2n = 268 \pm 4$) в профазе I мейоза помимо доминирующих бивалентов выявлялись тетравалентные ассоциации. Наличие тетравалентов в пахитене даёт основание предполагать, что процесс редиплоидизации генома у калуги продвинут в меньшей степени, чем у также тетраплоидных сибирского осетра и *A. transmontanus* (Van Eenennaam et al., 1998), у которых тетраваленты пока не были обнаружены.

В профазе I мейоза у гибридов «стерлядь x калуга», полученных на Лучегорской НИС ТИНРО, с помощью иммунофлуоресцентного анализа, были обнаружены сложные мультивалентные ассоциации: триваленты, тетраваленты, цепочки мультивалентов. Такие гибридные самцы характеризуются сильно пониженной фертильностью, как и другие гибриды между видами осетров с различными уровнями плоидности.

Возвратный гибрид F3 «стерлядь x бестер» был получен на базе экспериментального рыбководного комплекса ФГБНУ ВНИРО. С помощью электронной микроскопии выявлено, что в сперматоцитах на стадии пахитены большинство бивалентов полностью синаптированы. Также в сперматоцитах наблюдаются униваленты, дискоориентация и асинапсис теломерных участков хромосом, интерлокинги, бреши осевых элементов, что ранее было отмечено для *A. transmontanus*. Такие сперматоциты способны сформировать полноценные сперматозоиды. И это подтверждает плодовитость исследованных гибридов, от которых впоследствии были получены F4 и F5.

Таким образом, изучение особенностей мейоза с помощью анализа СК у исследованных видов, в истории которых полиплоидия играла большую роль, а также у их межвидовых гибридов, даёт ценную информацию для познания цитогенетических отношений и особенностей эволюции осетровых.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГОМЕОБОКССОДЕРЖАЩИХ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *Pitx* ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ: СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СИНТЕННИЯ ЛОКУСОВ

В.Н. Смирский, Ю.В. Маркитантова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: yuliya.mark@gmail.com; simir@mail.ru

Стремительное развитие технологий секвенирования и биоинформационных подходов способствует появлению массива данных по транскриптому тканей и геному хвостатых амфибий (Urodela), обладающих высокими регенерационными способностями. Накопление этой информации

позволяет проводить детальный сравнительный анализ структурной организации генома позвоночных. Ведущую роль в работе генных сетей играют гомеобоксодержащие гены. В частности, гены семейства *Pitx* участвуют в контроле морфогенеза ряда тканей и органов в развитии и процессах регенерации. Для поиска полноразмерных транскриптов в базах данных транскриптома тритона *Pleurodeles waltl* и генома аксолотля *Ambystoma mexicanum* проведён биоинформационный анализ генов *Pitx1*, *Pitx2*, *Pitx3* и их изоформ у *Urodela*. В норме и при регенерации сетчатки *P. waltl* секвенированием продуктов ПЦР идентифицированы транскрипты *Pitx1*, *Pitx2*, содержащие гомеодомен и участок, кодирующий домен OAR. Анализ нуклеотидных последовательностей с помощью множественного выравнивания с соответствующими мРНК и построения филогенетических деревьев (метод ближайших соседей, Neighbor-Joining), подтвердил гомологию одного из фрагментов с геном *Pitx1*, а другого – с *Pitx2*. Эти нуклеотидные последовательности были использованы в качестве зондов для поиска полноразмерных транскриптов *Pitx1* и *Pitx2* в базе данных транскриптома разных тканей тритона *P.waltl* [1]. В результате скрининга обнаружен 21 транскрипт, 8 из которых гомологичны *Pitx1*, а 13 – *Pitx2*. Транскрипты *Pitx1* тритона наиболее сходны с таковыми у шпорцевой лягушки и курицы, а *Pitx2* – с транскриптами этого гена у человека, кодируемые белки содержат консервативные гомеодомен и домен OAR, характерные для всех генов семейства *Pitx*. У тритона *Synops pyrrohogaster* [2] обнаружено 27 транскриптов, кодирующих регуляторные факторы *Pitx1*, *Pitx2*, в мозге, сердце, конечностях, хрусталике и глазном бокале. Из них 22 транскрипта (12 изоформ *Pitx1* и 10 – *Pitx2*) – в глазном бокале, причем 17 являются специфичными для глазного бокала. В сетчатке этого вида тритона (30 сут. регенерации) экспрессируются 7 изоформ *Pitx1* и *Pitx2*, не обнаруженные на других сроках регенерации, что свидетельствует о регуляции экспрессии на уровне сплайсинга. Изоформы *Pitx2* не имеют OAR домена. В результате расширенного поиска гомологов генов семейства *Pitx* в базах по транскриптому тканей *Urodela* (TSA: Transcriptome Shotgun Assembly, PubMed), идентифицировано 8 изоформ *Pitx1* и 9 изоформ *Pitx2* у *A.mexicanum*, *A.maculatum*, *Hynobius retardatus*, *H.chinensis* и *Tylotriton wenxianensis*. У *A.mexicanum* локусы генов *Pitx1* и *Pitx2* были выявлены на хромосомах 3 (3P) и 6 (6Q), соответственно. Расположение соседних генов в этих локусах соответствует их расположению на хромосомах у других позвоночных (консервативная синтения). У всех этих видов *Urodela* (включая *P.waltl*) не удалось обнаружить транскрипты, гомологичные *Pitx3*, кроме тритонов *Hynobius*, у которых выявлены 2 изоформы *Pitx3*. Более детальный поиск паралогов *Pitx3*, с использованием в качестве зондов нуклеотидных последовательностей, кодирующих консервативные домены *Pitx3* (гомеодомен и домен OAR), также не дал результатов. Анализ синтении генов подтвердил отсутствие гена *Pitx3* у *A.mexicanum*. Синтенные гены (*GBF1*, *Nfkb2*, *PSD*, *Nolc1*), характерные для локуса *Pitx3* у разных видов позвоночных обнаружены у *A.mexicanum* на хромосоме 8, причем порядок расположения этих генов соответствует таковому у других позвоночных, тогда как ген *Pitx3* в этом локусе отсутствует. Отсутствие некоторых гомеобоксодержащих генов продемонстрировано у других хвостатых амфибий. В частности, у *A.mexicanum* не обнаружен ген *Pax3*, функцию которого у этого вида, по-видимому, выполняет ортолог *Pax7* [3]. Выявлены видовые различия в структурно-функциональной организации изучаемых генов и их локусов, видовая и тканевая специфичность экспрессии у представителей разных семейств *Urodela* (*Hynobiidae*, *Ambystomatidae*, *Salamandridae*). Очевидно, что при сходстве ключевых молекулярных участников, существуют эволюционно закреплённые функциональные различия в генетических программах регуляции дифференцировки клеток сетчатки позвоночных, что может определять специфичность стратегий регенерационных ответов и морфогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matsunami M., Suzuki M., Haramoto Y. et al. // DNA Res. 2019. Vol. 26 (3). P. 217–229. Doi: 10.1093/dnares/dsz003
2. Nakamura K., Islam Md.R., Takayanagi M. // PLoS ONE. 2014. Vol. 9 (10). P. e109831.
3. Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei Ji-F. et al. // Nature. 2018. Vol. 554. P. 50–55. Doi.org/10.1038/nature25458

Работа выполнена в рамках темы НИР № ИНГЗ 0108-2019-0005.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ У ВИДОВ РОДА *Helianthus* L.

В.А. Хачумов, К.В. Азарин, А.А. Ковалевич, К.Ф. Кан, М.С. Макаренко, А.В. Усатов

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: VladimirKhachumov@yandex.ru

Род *Helianthus* L., по данным общепризнанного систематика Ч. Хейзера, включает в себя 49 видов – 11 однолетних и 38 многолетних. Данная систематика в основном опирается на морфофизиологические признаки [1]. На сегодняшний день в базу данных NCBI включены полные нуклеотидные последовательности хлДНК 11 видов подсолнечника (трёх однолетних и восьми многолетних), что явно недостаточно для корректного анализа межвидовой изменчивости пластома внутри данной таксономической группы.

Целью работы является сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов четырёх однолетних (*H. annuus*, *H. argophyllus*, *H. petiolaris*, *H. praecox*) и восьми многолетних (*H. grosseserratus*, *H. hirsutus*, *H. microcephalus*, *H. occidentalis*, *H. rigidus*, *H. salicifolius*, *H. strumosus*, *H. tuberosus*) видов рода *Helianthus* L. из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.

Хлоропласты выделяли из первой пары листьев 14-дневных проростков подсолнечника по методу Triboush et al. с нашими модификациями [2]. ДНК выделяли коммерческим набором «СорБГМО-Б» (Синтол, Россия) и готовили библиотеки для секвенирования с использованием набора реактивов Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкциям производителей. Полученные ДНК-библиотеки секвенировали на платформе HiSeq 2000 (Illumina, США). В качестве образца сравнения использовали пластидный геном линии НА383 (NC_007977.1) из базы данных NCBI, на который выравнивали короткие чтения и собирали геномы *de novo* [2].

Размеры хлоропластных геномов исследованных образцов варьировали от 150 890 (*H. rigidus*) до 151 147 п.н. (*H. grosseserratus*) и включали в себя большой (LSC – large single copy) и малый (SSC – small single copy) однокопийные районы, а также два инвертированных повтора (IR – inverted repeats). Размер LSC-области варьирует от 83 541 (*H. rigidus*) до 83 659 п.н. (*H. grosseserratus*), SSC-региона – от 18 169 (*H. rigidus*) до 18 302 п.н. (*H. petiolaris*) и IR региона – от 24 590 (*H. rigidus*) до 24 630 п.н. (*H. petiolaris*).

В результате сравнительного анализа хлоропластных геномов всего определен 441 полиморфный сайт: 296 SNP, 70 INDEL и 75 SSR (табл.). Наибольшее количество полиморфных SSR-локусов было определено при сравнении хлДНК линии НА89 с *H. microcephalus* – 52, а наименьшее с *H. praecox* и *H. petiolaris* – 16. Наибольшее количество SNP отмечено у *H. tuberosus* – 202, наименьшее у *H. petiolaris* – 15. Наибольшее количество INDEL обнаружено у *H. salicifolius* – 44, у *H. argophyllus* и *H. petiolaris* таковых не было.

**Первичная структура хлДНК у однолетних и многолетних видов подсолнечника
и количество SSR, SNP и INDEL, локализованных в ней**

Вид	Размер хлДНК, п.н.	LSC, п.н.	SSC п.н.	IR (2x), п.н.	Количество полиморфных сайтов			
					SSR	SNP	INDEL	
Однолетние	<i>H. annuus</i>	151 094	83 541	18 295	24629x2	23	22	1
	<i>H. argophyllus</i>	151 072	83 522	18 298	24626x2	17	22	0
	<i>H. petiolaris</i>	151 088	83 526	18 302	24630x2	16	15	0
	<i>H. praecox</i>	151 066	83 516	18 300	24625x2	16	26	1
Многолетние	<i>H. grosseserratus</i>	151 152	83 659	18 247	24623x2	38	169	22
	<i>H. hirsutus</i>	150 951	83 551	18 188	24606x2	37	185	24
	<i>H. microcephalus</i>	151 140	83 650	18 296	24597x2	52	193	37
	<i>H. occidentalis</i>	151 143	83 652	18 291	24600x2	29	162	20
	<i>H. rigidus</i>	150 890	83 541	18 169	24590x2	36	160	26
	<i>H. salicifolius</i>	151 117	83 645	18 268	24602x2	46	188	44
	<i>H. strumosus</i>	151 144	83 674	18 272	24599x2	33	177	27
<i>H. tuberosus</i>	151 131	83 627	18 296	24604x2	47	202	43	

Таким образом, структура исследованных образцов в целом сходна, однако для многолетних видов подсолнечника был показан более высокий уровень изменчивости хлоропластных геномов, чем для однолетних. Важно отметить, что полученные данные позволяют кластеризовать исследуемые образцы на однолетние и многолетние виды, а также могут стать основой для создания эффективных тест-систем, идентифицирующих различные виды подсолнечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schilling E.E., Heiser C.B. // Taxon. 1981. Vol. 30. P. 393–403.
2. Azarin K., Maksim Makarenko, Alexander Usatov et al. // Data in brief. 2019. August 25. P. 104072.

Результаты получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект № 6.929.2017/4.6, на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» Южного федерального университета

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ
ПЛЕМЕННОЙ ЦЕННОСТИ ПО СОВОКУПНОСТИ ПРИЗНАКОВ
МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ПУТЁМ ИТЕРАЦИОННОГО
ВЫЧИСЛЕНИЯ КОВАРИАЦИОННОЙ
МАТРИЦЫ ОСТАТОЧНОЙ ОШИБКИ**

Ф.С. Шарко^{1,2}, Е.Б. Прохорчук^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312, Российская Федерация, г. Москва, пр. 60 лет Октября 7-1

²ЗАО «Геноаналитика», 119234, Российская Федерация, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 77, офис 102,

E-mail: fedosic@gmail.com

В 1973 г. американский учёный Ч. Хендерсон предложил для оценки генетического вклада животных процедуру наилучшего линейного несмещенного прогноза (от англ. – *Best Linear Unbiased Prediction, BLUP*) [1]. Данный метод позволяет оценить племенную ценность на основании информации

о продуктивности потомков оцениваемого животного в сравнении с продуктивностью других животных в популяции [2]. Первое полное комбинирование информации о происхождении и о молочной продуктивности животных произошло при разработке и интеграции математического метода *BLUP AM* в молочное животноводство. Для реализации процедуры *BLUP* требуется определить линейную биометрическую модель изучаемой популяции. Линейная модель – это уравнение, которое позволяет оценить, какие независимые переменные или факторы влияют на изменчивость хозяйственно-полезных признаков в рамках изучаемой популяции:

$y = X\beta + Zu + e$, где y – вектор из n наблюдаемых случайных величин, β – вектор из p фиксированных эффектов, X и Z – известные матрицы, u и e – векторы q и n случайных эффектов, такие что $E(u) = 0$ и $E(e) = 0$

В данной работе мы восстанавливаем часть недостающей информации в матрице родства путем итерационной оценки матрицы R (ковариационная матрица остаточной ошибки e) для *AM*-модели. Для этого мы применяем *EM-алгоритм* [3] – алгоритм, используемый в математической статистике для нахождения оценок максимального правдоподобия параметров вероятностных моделей, в случае, когда модель зависит от некоторых скрытых переменных. Сначала происходит оценка латентных переменных по текущему приближению параметров, а затем находится оценка параметров, максимизирующая правдоподобие оценки латентных переменных и повторяется до тех пор, пока не сойдется к максимуму правдоподобия. В первом приближении мы считаем, что матрица R – диагональная, и решив *AM*-модель с ней, мы получаем оценку внутренних параметров (β и u) модели, а затем в следующей итерации находим следующее приближение оценки матрицы R , используя ту же *AM*-модель. Тем самым улучшая точность оценки нашей *AM*-модели.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Henderson C.R.* // *Biometrics*, 1976. Vol. 32. P. 69–83.
2. *Hayes B. and Goddard M.* // *Genome*. Vol. 53, № 11. 2010. P. 876–883.
3. *Hastie Trevor, Robert Tibshirani, Jerome Friedman* // *The Elements of Statistical Learning*. New York: Springer, 2001. P. 236–243.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации проекта по Соглашению № 14.579.21.0147 о предоставлении субсидии (уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI57917X0147) и за счет гранта РФФИ 17-29-08033

ПРОГНОЗЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VITRO* ВЛИЯНИЯ НЕАННОТИРОВАННЫХ SNPs ПРОМОТОРОВ ЭРИТРОИДНЫХ ГЕНОВ НА АФФИННОСТЬ ТВР/ТАТА И КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ

Е.Б. Шарытова, И.А. Драчкова, И.В. Чадаева, М.П. Пономаренко, Л.К. Савинкова

Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

E-mail: sharytova@bionet.nsc.ru; idrachkova@mail.ru; ichadaeva@bionet.nsc.ru; pon@bionet.nsc.ru; savinkl@mail.ru

Гемоглобин (Hb) человека, белок, который переносит кислород из легких в ткани, представляет собой тетрамер, состоящий из двух α -подобных и двух β -подобных цепей глوبيна. Наследственные нарушения синтеза гемоглобина являются причиной наиболее распространенного класса моногенных заболеваний в мире – различной тяжести талассемий. Помимо α - и β -глобинов у человека также синтезируется эмбриональный ζ -глобин и γ -глобин плода. Сразу после рождения их экспрессия

прекращается, и экспрессируется преимущественно ген β -глобина взрослого. Показано, что, кроме эритроидных клеток, гемоглобин широко экспрессируется и в неэритроидных клетках, включая нейроны коры, гиппокампа и мозжечка мозга грызунов, нейроны мозга эмбрионов и взрослых мышей и мезенцефалические допаминергические клетки мозга человека, мыши и крысы. В последние годы появляется все больше доказательств того, что различные формы анемии, изменения в количестве и качестве клеток крови, могут быть вовлечены в патогенез различных когнитивных расстройств и психических заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, депрессии различной степени, биполярные расстройства и др. [1].

В настоящей работе в результате анализа *in silico* 161 неаннотированного SNPs предсказаны 45 кандидатных SNP-маркеров для 15 генов (из 25 участвующих в эритропоэзе), способных достоверно изменять сродство ТВР к ТАТА-боксам промоторов генов. Часть из них выбрана для экспериментальной верификации *in vitro*. Результаты влияния замен в ТАТА-боксах на аффинность ТВР/ТАТА и скорости образования и распада комплексов ТВР/ТАТА представлены в таблице. Например, экспериментальная проверка влияния неаннотированного SNP (rs 34500389) гена *HBB*, приводящего ТАТА-бокс к более каноническому виду (САТААААААG → ТАТААААААG) показала, как и прогнозировалось, увеличение сродства ТВР/ТАТА в 1,56 раза ($K_D = 50$ нМ для WT и 32 нМ для минорного аллеля) за счет увеличения скорости образования комплексов также в 1,5 раза, скорость распада и время жизни комплексов остались практически без изменения. Обнаруженный нами неаннотированный SNP (rs113180943) в ТАТА-боксе промотора гена *HbZ*, заменяющий третий «Т», имеющий максимальный вес среди нуклеотидов в последовательности ТАТА-бокса, на «А», по прогнозу должен приводить к уменьшению аффинности ТВР/ТАТА. Экспериментальная верификация *in vitro* показала, что эта замена действительно приводит к уменьшению аффинности ТВР/ТАТА в 6,6 раза ($K_D = 6$ нМ в норме и $K_D = 40$ нМ при $-29T>A$). Происходит это в результате того, что скорость образования комплексов (k_a) снижается в 19,5 раза, а скорость распада (k_d) комплексов снижается в 3 раза. Как известно, синтез α -глобина начинается в желточном мешке на третьей неделе эмбриогенеза. К пятой неделе его уровень падает и начинается синтез ϵ -глобина плода. Снижение экспрессии гена *HbZ* в результате замены в ТАТА-боксе (rs113180943) может привести к стадия-зависимому нарушению событий «переключения» генов гемоглобинов и развитию эритробластоза. Таким образом, rs113180943 может быть кандидатным SNP-маркером тяжелых гемоглобинопатий, а также когнитивных и психических расстройств, связанных с нарушением кровоснабжения мозга.

Таблица

Экспериментальное определение *in vitro* влияния SNP на аффинность и кинетические параметры взаимодействия ТВР/ТАТА

Ген	Allele	Sequences (5' – 3' strands), 26 bp	Прогноз	Эксперимент				
			$-\ln K_D$	$-\ln K_D$	K_D , нМ	k_a , $M^{-1}s^{-1}$	k_d , s^{-1}	
<i>HbB</i>	WT	agggtctgggСАТАААААGtcagggcag	19,20	16,81	50±7	$(1,4±0,1) \cdot 10^4$	$(7,1±0,7) \cdot 10^{-4}$	
	rs34500389 (-32C>T)	agggtctgggТАТАААААGtcagggcag	20,18	17,26	32±3	$(2,1±0,1) \cdot 10^4$	$(6,6±0,5) \cdot 10^{-4}$	
<i>HbZ</i>	WT	agctccctgТАТАААGgggaccctg	20,76	18,93	6±1	$(4,5±0,4) \cdot 10^4$	$(3,0±0,6) \cdot 10^{-4}$	
	rs113180943 (-29T>A)	agctccctgТАААТАAGgggaccctg	19,28	17,03	40±20	$(2,3±0,2) \cdot 10^3$	$(1,0±0,4) \cdot 10^{-4}$	
<i>EPOR</i>	WT	cacgtcatcТАТТТТGtctgctacg	18,24	15,59	170±30	$(2,8±0,3) \cdot 10^3$	$(4,6±0,6) \cdot 10^{-4}$	
	rs1006576690 (-27T>A)	cacgtcatcТАТАТТТGtctgctacg	19,39	18,33	11±3	$(9,3±0,7) \cdot 10^3$	$(1,0±0,3) \cdot 10^{-4}$	
	rs971717705 (-29A>G)	cacgtcatcTGТТТТGtctgctacg	18,11	15,71	150±30	$(2,4±0,3) \cdot 10^3$	$(3,6±0,5) \cdot 10^{-4}$	
	rs567946217 (-31c>A)	cacgtcaТАТАТТТTgtctgctacg	19,33	17,68	21±6	$(6,8±0,7) \cdot 10^3$	$(1,4±0,4) \cdot 10^{-4}$	
	rs567946217 (-31c>g)	cacgtcatgТАТТТТGtctgctacg	18,51	16,34	80±10	$(3,6±0,3) \cdot 10^3$	$(3,0±0,5) \cdot 10^{-4}$	

Кроме того, что носители аллеля rs113180943 могут страдать гемоглобинопатией, они с большой вероятностью подвержены риску иметь психические расстройства (чаще биполярное расстройство), связанные с гипоксией/гипероксией центральной нервной системы.

Изучение регуляторных механизмов, с помощью которых обнаруженные SNP-маркеры делают вклад в развитие гемоглобинопатий и ассоциированных с ними когнитивных нарушений, позволит врачам своевременно принимать не только адекватные меры для лечения гемоглобинопатий, но и профилактические меры, предупреждающие развитие психических расстройств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Altinoz M.A., Ince B. // J. Dev. Neurosci. 2017. Vol. 61. P. 73–85.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ *HERC2* (rs12913832) и *OCA2* (rs1800407) С ВАРИАЦИЕЙ ЦВЕТА ГЛАЗ В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

М.В. Шинкевич, А.В. Кондратюк, С.В. Вакула, М.Н. Шантуренко, А.В. Кильчевский

*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, 220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27
E-mail: m.shinkevich@igc.by*

С целью разработки прогностической модели судебно-медицинской экспертизы для белорусской популяции, мы проводим изучение связи между SNPs, ассоциированных с пигментацией и цветовой вариацией радужки глаз. В исследование было отобрано 627 добровольцев (380 женщин и 247 мужчин) с различными вариантами пигментации, проживающих на территории Беларуси. Цифровые имиджи радужки глаз были получены при помощи макросъемки с использованием фотокамеры Canon 750d и преобразованы из RGB-триплета в HSV-триплет. Для автоматизированной идентификации вариантов пигментации на основе субъективной оценки коллекции изображений радужки были созданы эталоны вариативности, соответствующие непигментированному и пигментированному (феомеланин и эумеланин) зонам. Референсные эталоны встроены в приложение Color Thresholder программного пакета MatLab, что позволило для каждого образца в автоматическом режиме произвести вычисление содержания и соотношения пигментированных (феомеланин, эумеланин) и непигментированных участков, соотнести фенотипические группы и далее выполнить анализ связи «маркер-признак».

С использованием метода TaqMan были генотипированы 209 образцов по вариантам rs12913832 (*HERC2*) и rs1800407 (*OCA2*). Полученные данные были подтверждены результатами секвенирования. Распределение аллелей в целевых участках было смещено в сторону G-аллели для обоих полиморфизмов: 79 % – rs12913832:G, 74 % – rs1800407:G. Согласно доминантной модели наследования, индивиды с аллелем А – кареглазые (rs12913832:A>G), однако в нашем исследовании 37 % генотипов с rs12913832:GA имели промежуточный цвет глаз.

Мы также исследовали прогностическую способность *HERC2*–*OCA2* полиморфизма в двухкомпонентной модели оценки цвета радужки: «темные/светлые» варианты радужки глаз. Высокое значение OR (>30) для rs12913832 подтверждает его значительное влияние на цвет глаз. При этом значение rs1800407 (<5.2) несколько ниже. Логистическая регрессия выявила низкий процент (3,9 %) некорректных предсказаний: 97,3 % светлоглазых и 92,9 % темноглазых людей были правильно классифицированы согласно *HERC2*(rs12913832)/*OCA2*(rs1800407) модели.

АНАЛИЗ *IN SILICO* САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNAs ВОКРУГ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА И ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

М.А. Шкурат¹, М.А. Амелина^{1,2}, Н.А. Григорян², Н.С. Пономарева¹

¹Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

E-mail: mikhail@shkurat.com; amelinamascha@yandex.ru; narine_g69@mail.ru

Недавние исследования показали, что некодирующие РНК (ncRNAs) регулируют многие процессы, такие как транскрипция, трансляция, клеточная дифференцировка, регуляция экспрессии генов и регуляция клеточного цикла [1, 2]. Однако из многих тысяч выявленных генов и транскриптовнекодирующей ДНК функционально охарактеризовано незначительное количество. Функциональная значимость некодирующей РНК особенно очевидна для класса длинных некодирующих (lncRNA) и микроРНК (miRNAs). Полиморфизмы и нарушение профиля экспрессии генов miRNA, в последние годы связывают с различными мультифакторными заболеваниями. Выявлено, что многие miRNA кодируются в межгенных участках ДНК и обнаружены в интронах. Показана важная роль miRNAs в эпигенетических процессах, которые контролируют дифференциацию и развитие живого организма.

Поиск мотивов гомологичных микро РНК осуществлялся в *цис*-регуляторных районах изучаемых генов с помощью биоинформационного пакета MEME Suite. Известные miRNA взяли согласно данным баз данных miRBase (<http://mirbase.org/>). Нуклеотидные последовательности *цис*-регуляторных районов и интронов генов взяты нами из электронных баз данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью наборов скрипта, IFITCH, которые были разработаны специально для автоматизированного получения информации от последовательностей NCBI. Анализ *in silico* проводили при помощи автоматического поиска сайтов связывания с использованием программы «mscanner» [3]. На момент проведения биоинформационного поиска в базе данных MiRBase было зарегистрировано 28645 микроРНК (<http://www.mirbase.org/>). В таблице представлены гены липидного обмена и ферментов антиоксидантной защиты, а также длины окрестностей некодирующей ДНК, локализованной перед этими генами и после них в геноме человека. Таким образом, общая протяжённость исследуемых последовательностей составила 3 098 209 нуклеотидов. При этом было изучено 788 404 нуклеотидов перед генами и 631 332 – после генов. Мы отметили, что наименьшее число нуклеотидов в межгенном пространстве было локализовано перед геном *TNF* – 1 243 нуклеотида, а самое большое перед геном *LIPC* – 209 736. Самое малое число нуклеотидов было после гена *APOC3* – 3 046 нуклеотида, а самое большое после гена *PPARGCIA* – 210 553 нуклеотидов.

Далее в работе использовали программу dotolog [4], которая предназначена для построения точечной матрицы гомологий (дотплота) для двух и более последовательностей. Данная программа позволяет проводить множественное выравнивание последовательностей. Отличительной особенностью программы также является поддержка отображения аннотаций к последовательностям и возможность добавления и редактирования пользовательских аннотаций, полученных по результатам визуального анализа. Интерфейс программы реализует концепцию «как GoogleMaps», предоставляя удобство ориентирования по последовательностям. При отображении широко используется цветовое кодирование, в частности, мотивы (непрерывные последовательности совпадений) подсвечиваются зеленым цветом. Пользовательские аннотации подсвечиваются цветом, сгенерированным по уникальному идентификатору элемента. Реализована возможность фильтрации отображаемых элементов. Таким образом, предоставляемый программой dotolog функционал позволяет эффективно выявлять исследуемые элементы генома.

Длины окрестностей некодирующей ДНК, локализованной перед и после исследуемых генов в геноме человека

Общепринятое название	Длина окрестности	Длина окрестности перед геном	Длина гена	Длина окрестности после гена
<i>FTO</i>	510505	50000	410505	50000
<i>LIPC</i>	485370	209736	158199	117435
<i>LPL</i>	97138	18949	28189	50000
<i>TNF</i>	11856	1243	2770	7843
<i>EDNI</i>	107420	44429	40732	22259
<i>PPARGC1A</i>	778172	47363	680809	210553
<i>PPARGC1B</i>	185490	7880	127610	50000
<i>PONI</i>	112197	35166	27031	50000
<i>SOD1</i>	96856	50000	9310	37546
<i>CAT</i>	85203	2067	33136	50000
<i>SOD2</i>	149435	15969	83466	50000
<i>NOS3</i>	87367	50000	23544	13823
<i>GPX4</i>	68959	16095	2864	50000

Результаты наших исследований показали, что наибольшее количество генов микро РНК локализовано в интронах генов *PPARGC1A* и *PPARGC1B*, а также в гене *FTO* (35 молекул микро РНК). Наименьшее количество сайтов связывания микро РНК локализовано в *цис*-регуляторных последовательностях гена *APOC1*. Согласно нашим данным биоинформационного анализа, в окрестностях гена *FTO* локализованы следующие мотивы: hsa-miR-619-5p (16), hsa-miR-5585-3p (2), hsa-miR-1285-3p (2), hsa-miR-3613-5p (1), hsa-miR-6788-5p (1), hsa-miR-3134 (1), hsa-miR-1256 (1), hsa-miR-320d (1), hsa-miR-6845-3p (1), hsa-miR-3133 (1), hsa-miR-649 (1), hsa-miR-1261 (1), hsa-miR-4496 (1), hsa-miR-4433b-5p (1), hsa-miR-297 (1), hsa-miR-183-5p (1), hsa-miR-3162-3p (1), hsa-miR-7110-5p (1), hsa-miR-4445-5p (1), hsa-miR-877-3p (1), hsa-miR-205-3p (1), hsa-miR-708-5p (1), hsa-miR-3140-5p (1), hsa-miR-2052 (1), hsa-miR-3661 (1), hsa-miR-1972 (1).

Типы зрелых мотивов микро РНК распределенных вокруг гена *PPARGC1B* hsa-miR-619-5p (5), hsa-miR-5585-3p (3), hsa-miR-1303 (2), hsa-miR-648 (1), hsa-miR-6125 (1), hsa-miR-552-3p (1), hsa-miR-2392 (1), hsa-miR-3074-5p (1), hsa-miR-6747-3p (1), hsa-miR-1271-3p (1), hsa-miR-1285-5p (1), hsa-miR-649 (1), hsa-miR-1304-5p (1), hsa-miR-4266 (1), hsa-miR-146a-3p (1), hsa-miR-6844 (1), hsa-miR-4261 (1), hsa-miR-378i (1), hsa-miR-527 (1), hsa-miR-378a-3p (1), hsa-miR-1285-3p (1), hsa-miR-345-5p (1), hsa-miR-133a-3p (1), hsa-miR-378g (1), hsa-miR-378a-5p (1), hsa-miR-378d (1)

Типы зрелых мотивов микро РНК, локализованных в окрестности гена *APOC1* – hsa-miR-619-5p (3), hsa-miR-629-3p (1), hsa-miR-4646-3p (1). В скобках указано количество копий.

Как видно из представленных результатов, наиболее часто в окрестностях изученных генов встречался мотив hsa-miR-619.

Нами отмечено, что количество локализованных сайтов связывания с микро РНК коррелирует с числом тканей в которых экспрессируются данные гены. Так ген *FTO* во взрослом организме экспрессируется в 23 из 23 исследованных тканях в проекте транскриптома человека, результаты которого представлены в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79068>). Ген *APOC1* экспрессируется только в четырех тканях из 23 исследованных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/341>).

ЛИТЕРАТУРА

1. Mattick J. // Bioessays. 2003. Vol. 25 (10). P. 930–939.
2. Maracaja-Coutinho V., Paschoal A.R., Caris-Maldonado J.C. et al. // Methods Mol. Biol. 2019. Vol. 1912. P. 251–285. Doi: 10.1007/978-1-4939-8982-9_10.
3. Shkurat T., Romanov D., Pshenichnyy E. et al. // American Journal of Applied Sciences. 2015. Vol. 12, №. 1. P. 1.
4. Романов Д.Е., Шкурят Т.П. Программа ЭВМ «Dotolog: программа для автоматизации визуального анализа дотплот-изображений нуклеотидных последовательностей ДНК» №2016663454 от 7 декабря 2016.

Исследование выполнено в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ по теме: «Исследования функциональной роли генетических полиморфизмов и микро РНК в геноме человека и животных», проект № 6.6762.2017 БЧ.

FLUORESCENCE ANALYSIS OF CHLOROPHYLL IN BARLEY GROWN IN POLLUTED SOIL

V. Rajput, V. Chaplygin, V. Lysenko, I. Sazonov, A. Barbashev, S. Sushkova, S. Mandzhieva

Southern Federal University, 344090, Russia, Rostov-on-Don, prosp. Stachki, 194/1

E-mail: rajput.vishnu@gmail.com; msaglara@mail.ru

Chlorophyll fluorescence is a non-invasive measurement of photosystem for photosynthetic performances of plants. The maximal quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) is one of the most important parameters of chlorophyll fluorescence and has been used as a non-destructive and accurate tool to precisely determine the physiological state of plants. Chlorophyll fluorescence has great potential as a tool to monitor the interaction between soil pollutant and plants [1–3].

Zinc is an essential mineral element for all types of plants as micronutrients. However, a high concentration in soils could increase their Zn content in the plant tissues and alter the plant performance. Zinc is a priority pollutant of soils in southern Russia [4]. Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most important food grain crops, and widely grown in Rostov-on-Don, Russia. According to the international standard ISO 11269-1, barley is recommended as a bio-testing and also identified as an efficient heavy metals accumulator and could accumulate Zn equal to Indian mustard (*Brassica juncea*), a hyper-accumulator plant [5].

To reveal the effects of Zn stress and role of biochar and diatomite on the chlorophyll fluorescence of barley, the experiment was conducted on Zn polluted soil to investigate the effects on the photosynthetic apparatus of barley.

The upper (0- to 20-cm) layer of Haplic Chernozem was used for the model experiment. Soil was sampled from a reserved virgin plot in the Persianovskaya steppe in the Rostov region (south of the European part of Russia). The soil had the following properties (g kg⁻¹): C_{org} 0.37; CaCO₃ 0.04; physical clay 6.36; clay 2.81; pH_{H₂O} 7.6; exchangeable bases (cmolc kg⁻¹): Ca²⁺ 31.0, Mg²⁺ 6.0, Na⁺ 0.06. Soil samples were analyzed by the commonly used Standard method for the Russian Federation.

Two kilograms of soil sifted through a 2 mm sieve were well mixed and filled in plastic pots with a closed drainage system. The experimental design included the control (original uncontaminated soil) and treatments with the addition of Zn acetate salts at a rate of 440 mg kg⁻¹, 2.5 % biochar and 2.5 % diatomite. The experiment was established in triplicate. Soil incubation at room temperature and normal lighting continued for one month. Then 15 seeds were sown per pot at 2 cm deep.

Plants are dark-adapted in the laboratory room with dark curtains and no artificial light source for 20 min before chlorophyll fluorescence measurements. During the measurement, the room temperature was the same as the growth environment of plants. The maximal quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) was measured using pulse amplitude modulated (PAM) fluorometer (Diving PAM, Waltz, Germany). Photosynthetic photon flux density (PPFD) of red measuring light was 0.15 mmol photons m⁻² s⁻¹ and PPFD of white saturating flash was 1800 mmol photons m⁻² s⁻¹. Fifteen readings were recorded by selecting fresh leaves and all the leaves were measured under the same condition.

The results showed that Zn suppressed maximal quantum yield of photosystem II in barley, while, the addition of biochar and diatomite improved the photosynthetic performance in plants. The maximal quantum yield of photosystem II decreased 14.23 % in plants grown in contaminated soil whereas; this decrease was less in biochar (5.64 %) and diatomite (1.67 %) than the control (Fig.). The decreases in quantum yield of photosystem II indicate a decline of the photosynthetic efficiency which may impact electron transport,

thylakoid number per granum, transpiration rate and stomatal conductance [3, 6, 7]. The maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) is an indication of dissociation of light-harvesting pigment systems of PSII.

Thus, the influence of biochar and diatomite on photosynthesis under stress condition was established. biochar and diatomite amendments to polluted soil could alleviate soil pollution toxicity and enhance barley growth.

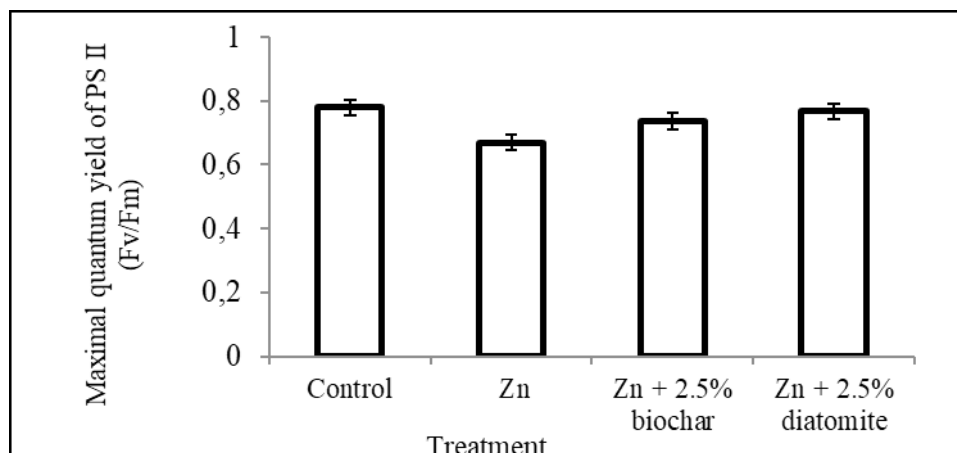


Fig. Assessment of maximal quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) of photosynthetic performance of barley in polluted with amendments

This research was supported by the Grant of the President of the Russian Federation (projects no. MK-2818.2019.5 and MK-2973.2019.4), the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (no. 5.948.2017/PP). The studies were performed on the equipment of the center for the collective use of the Southern Federal University “High Technologies”, “Biotechnology, Biomedicine and Environmental Monitoring”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lysenko V.S., Varduny T.V., Kosenko P.O. et al. // Russian Journal of Plant Physiology. 2014. Vol. 61 (3). P. 419–425. Doi.org/10.1134/s102144371403008x
2. Moustaka, M., Malea P., Haritonidou K. et al. // Environmental Science and Pollution Research, 2017. Vol. 24 (19). P. 16007–16018. Doi: 10.1007/s11356-017-9174-3
3. Rajput V., Minkina T., Fedorenko A. et al. // Science of the Total Environment. 2018. Vol. 645. P. 1103–1113. Doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.211
4. Minkina T.M., Linnik V.G., Nevidomskaya D.G. et al. // Journal Soils Sediments. 2018. Vol. 18 (6). P. 2217–2228. Doi.org/10.1007/s11368-017-1708-2
5. Ebbs S.D., Kochian L.V. // Environmental Science & Technology. 1998. Vol. 32. P. 802–806.
6. Costa D.M.V.J., Sharma P.K. // Photosynthetica 2016. Vol. 54. P. 110–119. Doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5
7. Perreault, F., Popovic, R., David, D. // Environmental Pollution. 2014. Vol. 185. P. 219–227. Doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.027

МЕТАМОРФОЗ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ТКАНИ *IN VITRO* В ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ДОНОРА ЭКСПЛАНТА У *Arabidopsis thaliana*

А.С. Азаров, А.В. Усатов, Н.Г. Дуплий

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: bioclon@list.ru

В ходе морфогенеза возникают сформированные заново ткани и органы, и соответствующие этому процессы носят названия, отражающие существо морфогенеза – гистогенез, ризогенез, гемморизогенез, флоральный геммогенез (образование цветков и (или) отдельных элементов цветка) [1]. Органогенез в культуре тканей растений является процессом, зависящим от многих факторов, как эндогенных, так и экзогенных. Эндогенный гормональный статус *in vivo* приводит к дифференцировке пролиферирующих клеток в различные органы. В культуре же тканей экзогенный гормональный баланс, как правило, статичен и является доминирующим над эндогенным балансом. В работах, как правило, используются пересевы на 2–3 среды, т.е. для тотипотентных клеток *in vitro* присутствует гормональная индукция, но не динамика. Часто это приводит к некрозу клеток в культуре тканей и остановке пролиферации именно при использовании одних и тех же сред для различных видов растений. Эта проблема с эксплантами частей пестика указана в работе на ирисах [2].

В нашей работе эксплантом – столбик с рыльцем – являлась часть пестика *Arabidopsis thaliana* линии *Ler*. Для инициации дедифференциации клеток экспланта была использована жидкая оригинальная среда [3] в модификации хелатом железа и микроэлементами среды NLN, с содержанием сахарозы 250 мг/л, а также мезоинозита – 100 мг/л, 2,4-D – 0,3 мг/л, 6-БАП – 0,05 мг/л, pH среды 6,33. Для индукции органогенеза была использована среда Кворина-Лепуавра (QL) с содержанием только 6-БАП – 1,5 мг/л и pH среды 5,86. Дедифференцировка происходила в течение четырёх недель на шейкере в чашках Петри в темноте при 25°С и RPM-65. После этого глобулярную ткань пассировали на жидкую среду (QL) в пробирки. Через две недели была отмечена инициация морфогенеза в виде зелёных укороченных иглообразных выростов, редкие инициации ризогенеза были не окрашены. После трёх недель культивирования оказалось, что зелёные образования имеют терминальный рост 5–6 мм и на их апикальном конце были расположены крупные прозрачные выросты, визуальнo сходные с сосочками рыльца пестика (рис.). Продольный срез образовавшихся зелёных структур, показал наличие внутри плотной, зелёного цвета клеточной ткани с белого цвета шаровидными тканевыми включениями. Истинных семян не наблюдалось.

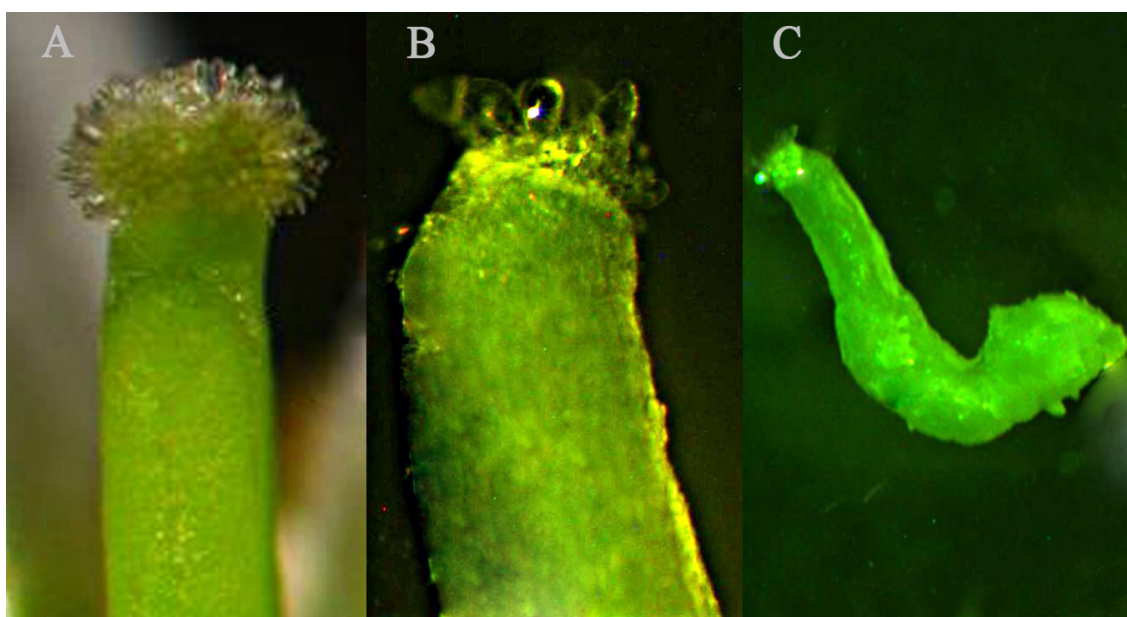


Рис. Внешний вид пестика и его фенотипического аналога у *Arabidopsis thaliana*:
А – часть пестика *A. thaliana*; В – часть фенотипического аналога экспланта пестика *A. thaliana*; С – общий вид фенотипического аналога экспланта пестика *A. thaliana*, полученного *in vitro*

Таким образом, данный метаморфоз произошёл при переходе с нашей оригинальной среды с низким содержанием солей на среду QL с высокими концентрациями солей и, наоборот, по содержанию сахарозы, а также в результате значительного изменения при смене сред гормонального состава.

Работа представляет интерес в плане отработки технологии получения культуры завязей при непрямом органогенезе для селекции *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бибикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлёв Ю.Н. // Комаровские чтения. 2007. Вып. 55. С. 184–211.
2. Тихомирова Л.И. // Turczaninowia. 2010. Vol. 13 (3). P. 148–150
3. Azarov A.S., Tokarev B.I., and Netchepurenko A.E. // Arabidopsis Information Service. 1990. Vol. 27. P. 9–12.

Работа выполнена на базе ЦКП Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг ЮФУ.

ИННОВАЦИОННАЯ МЕТОДИКА ДЕКОНТАМИНАЦИИ АРХЕОЛОГИЧЕСКОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

О.Ю. Арамова¹, Т.Г. Фалеева^{1,2,3}, М.А. Махоткин², А.И. Андриянов¹, И.В. Корниенко^{1,2,4}

¹Научная лаборатория «Идентификация объектов биологического происхождения» Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Южный научный центр Российской академии наук, 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

³Филиал № 2, III Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз Министерства обороны Российской Федерации, 344000, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Лермонтовская, 60

⁴Калмыцкий научный центр Российской академии наук», 358000, Российская Федерация, г. Элиста, ул. им. И.К. Илишкина, 8

E-mail: ararova.olya@mail.ru; tatiana.fal@mail.ru; mmakhotkin@mail.ru; yanov-sait.1@ya.ru; ikornienko@yandex.ru

В современных лабораториях, в которых объектом исследования является биологический материал различного происхождения, существует проблема контаминации лабораторного инструментария, оборудования и объектов исследования чужеродной ДНК. Это усложняет и порой делает невозможной интерпретацию полученных результатов, в особенности при поточных исследованиях. Источниками контаминации могут быть как ампликоны, присутствующие в большом количестве в ПЦР-лабораториях, так и слюна, кровь, контактные следы людей, взаимодействующих с исследуемым образцом и/или рабочей поверхностью в лаборатории. Так, по данным собственных исследований, на 1 см² кожных покровов ладони человека приходится около 2 нг ДНК [1]. Исходя из этого, возникают проблемы с достоверностью и воспроизводимостью полученных результатов [2].

Для решения данной проблемы в лаборатории «Идентификация объектов биологического происхождения» ЮФУ была разработана новая методика очистки от чужеродной ДНК, представленной не только в виде ампликонов, но и в составе клеток. В генетических лабораториях ДНК как загрязнитель далеко не всегда находится в виде свободных молекул (экстрактов, ампликонов), а нередко встречается в составе клеток, тканей, потожирового вещества и т.п. Поэтому разработанная методика основана на использовании специального раствора, который вызывает не только деградацию свободной ДНК, но и разрушает её в составе различных биологических структур, что не под силу существующим аналогам, действие которых направлено только лишь на «голые» молекулы ДНК. Кроме того, разработанный раствор позволяет избавиться от посторонних ДНК и клеток на поверхности других биологических объектов, таких как, например, костный материал, в том числе археологический.

При проведении экспериментального исследования по деконтаминации, археологический костный материал (костный порошок, полученный из шести костей VI – VIII вв. н. э.) был смешан с клетками HeLa в соотношении 10 000 клеток на 1 грамм костного порошка. В виду того, что образец был измельчен и гомогенизирован, это усложняло поставленную задачу. Тем не менее после проведения

мягкого дифференциального лизиса современной клеточной культуры в составе древнего костного порошка анализ полиморфных микросателлитных локусов ядерной ДНК показал, что с помощью разработанной методики успешно удалось избавиться от ДНК привнесенных клеток и получить чистые генетические профили археологических образцов. Данные результаты были подтверждены в независимой лаборатории на базе ЮНЦ РАН.

Таким образом, способ деконтаминации на основе данного раствора может иметь широкий спектр применения в различных биологических, молекулярно-генетических, микробиологических, клинических, клинико-диагностических, экспертных, судебно-медицинских лабораториях, а также на биотехнологических предприятиях. На данный момент методика апробирована и находится на стадии патентования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фалеева Т.Г., Иванов И.Н., Мишин, Е.С. Подпорошникова Е.Э. и др. // Генетика. 2018. Т. 54. № 6. С. 727–734.
2. Корниенко И.В., Харламов С.Г. Методы исследования ДНК человека: выделение ДНК, ее качественная и количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения. Ростов н/Д.: ЮФУ, 2012. 216 с.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *MC1R* В ПРАКТИКЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ НЕИЗВЕСТНОГО ИНДИВИДА ПО ЕГО ДНК

С.И. Вакула, М.В. Шинкевич, М.Н. Шантуренко, А.В. Кондратюк, А.В. Кильчевский

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. 220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27
E-mail: svettera@yandex.ru*

Рецептор меланоцитостимулирующего гормона (MSH-R) играет важную роль в регуляции цвета кожи и волос позвоночных. MSH-R – это сопряжённый с G-белком поверхностный рецептор меланоцитов, который под воздействием двух конкурирующих лигандов (α -меланоцитстимулирующего гормона (α MSH) и белка агуты(ASIP)) инициирует сложный сигнальный каскад, приводящий к выработке чёрного пигмента эумеланина (преимущественно стимулируется α MSH) или красно-коричневого феомеланина (преимущественно стимулируется ASIP).

У человека MSH-R экспрессируется с одноэкзонного (3099 п.н.), высокополиморфного гена *MC1R* (OMIM# 155555, 16q24.3). В различных популяциях было выявлено более 100 несинонимичных замен *MC1R*, ассоциированных с вариацией цвета кожи и волос, риском развития меланомы, склонностью к развитию витилиго и фотостарению кожи. Предложено несколько моделей предсказания цвета кожи и волос неизвестного индивидуума исходя из наличия определенных однонуклеотидных вариантов (SNP) гена *MC1R*. Из 24 SNP, учитываемых в модели определения цвета глаз и волос индивидуума по его ДНК - HIrisPlex, одиннадцать расположены в гене *MC1R*. При этом точность предсказания моделью цвета волос (категории светлые, каштановые, рыжие, тёмные) составляет 73 %. Генетические варианты *MC1R* характеризуются различной пенетрантностью, а в компаунд-гетерозиготе их эффект может зависеть от фазы сцепления. Это и те эффекты, которые среда оказывает на уровень активности MSH-R, затрудняют анализ ген-фенотипических ассоциаций.

В рамках союзной программы «ДНК-идентификация» нами собрана коллекция из 700 образцов ДНК и материала волос жителей Республики Беларусь. Данные о цвете кожи, склонности к загару, образованию веснушек получены на основе анкетирования. С использованием методики SNaPshot® Multiplex System и протокола генотипирования системы HIrisPlex проведен генетический анализ 300 образцов коллекции. Для 8 SNP гена *MC1R* частоты встречаемости минорных вариантов аллелей (MAF) варьировали от 0,01 (rs11547464, rs885479, Y152O1H, rs110400) до 0,07 (rs1805006), что выше указанных

в литературе значений. Однако в первую очередь в анализ были взяты рыжеволосые индивидуумы, что сместило значения MAF. Дальнейшие исследования образцов коллекции должны минимизировать выявленный эффект.

Среди проанализированных генотипов не было выявлено носителей инсерции N29insA/A и варианта rs2228479/A (встречаемость в мировой популяции 0,001 и 0,096, соответственно). Девять процентов проанализированных образцов составляют компаунд-гетерзиготы, чаще всего в их составе встречается вариант rs1805006(C/A). Секвенирование кодирующей последовательности гена *MC1R* методом Сангера выявило 59 однонуклеотидных вариантов, отличных от референса базы NCBI (NC_000016.10). Большинство (46 из 59) отмеченных полиморфизмов относятся либо к синонимичным заменам, не влияющим на функции белка, либо к SNP с невыявленным функциональным значением. Дальнейший анализ и расширение коллекции позволит не только изучить уровень полиморфизма гена *MC1R* у представителей населения Республики Беларусь, но и адаптировать существующие модели предсказания цвета волос индивида по его ДНК.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЁНОК

А.В. Гильдебрант, Д.Н. Кушнарёва, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: gildebrant@sfedu.ru; dkushnaryova@sfedu.ru; issa@sfedu.ru; samara@sfedu.ru

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – органические вещества, образованные из двух и более конденсированных бензольных колец. Этой группе загрязняющих веществ уделяется большое внимание из-за их канцерогенности, тератогенности и мутагенности. Основным антропогенным источником образования и поступления ПАУ в окружающую среду является неполное сгорание органических соединений в энергетических и производственных процессах. ПАУ плохо растворимы в воде и способны к накоплению в почве, а также содержатся в воде и атмосферном воздухе [1].

Целью данного исследования было изучить влияние двух ПАУ в различных концентрациях (нафталин – 0,005 %; 0,01; 0,02; антрацен – 0,00005; 0,0001, 0,0002 %) на интенсивность образования биопленок штаммами *Pseudomonas putida* 8ado, *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-1124, *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-1035. Для количественного определения интенсивности образования биоплёнок использовался метод окрашивания кристаллическим фиолетовым [2, 3].

В ходе исследования было установлено, что нафталин оказывает максимальное стимулирующее действие на интенсивность образования биоплёнки штаммом *P. putida* 8ado в концентрации 0,01 % – значение оптической плотности на 249,45 % выше контроля. Максимальное подавляющее воздействие нафталин оказывает на образование биоплёнки штаммом *V. aquamarinus* ВКПМ В-1124 в концентрации 0,02 % – оптическая плотность на 92,51 % ниже контроля.

Антрацен показал максимальное стимулирующее действие на интенсивность биопленкообразования штаммом *V. aquamarinus* ВКПМ В-1124 в концентрации 0,0002 % – оптическая плотность выше контрольных значений на 113,63 %. Подавляющего эффекта в исследованных концентрациях на интенсивность образования биоплёнок для всех исследованных штаммов не обнаружено.

Таким образом, исследованные ПАУ могут оказывать различное воздействие на микробные сообщества, как стимулирующее (антрацен и нафталин), так и подавляющее (нафталин), что может приводить к нарушениям структуры природных микробиоценозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Han J., Liang Y., Zhao B. et al. // Environmental Pollution. 2019. Vol. 251. P. 312–327.
2. Гильдебрант А.В., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т. 14? № 1. С. 86–91.
3. Гильдебрант А.В., Кушнарёва Д.Н., Каплина А.В и др. // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19. Вып. 1. С. 103–111.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 6.2379.2017/ПЧ), РФФИ (проект № 17-04-00787).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БОТАНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЁДА МЕТОДОМ МЕТАБАРКОДИРОВАНИЯ

А.А. Криницина^{1,2}, А.С. Сперанская^{1,3}, Т.В. Сизова³, Е.Э. Северова¹, А.В. Федотова¹,
Д.О. Омельченко⁴, А.А. Касьянов^{4,5}, А.С. Айгинин⁶, М.Д. Логачева⁶

¹Московский государственный университет, 119991, Российская Федерация, г. Москва, GSP-1, Ленинские горы, 1/12

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127422, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, 111123, Российская Федерация, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а

⁴Институт проблем передачи информации, 127051, Российская Федерация, г. Москва, Большой каретный пер., 19/1

⁵Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Губкина, 3

⁶Сколковский институт науки и технологий, 143026, Российская Федерация, г. Москва, ул. Нобеля, 3
E-mail: hanna.s.939@gmail.com; krinitsina@msu-botany.ru; olonare@mail.ru; elena.severova@mail.ru; mikrobiomsu@list.ru; omdeno@gmail.com; artem.kasianov@gmail.com; ayginin75@gmail.com; maria.log@gmail.com

Ботаническое происхождение мёда по традиции определяется при помощи палинологического анализа, т.е. по пыльцевому спектру, представленному в продукте. Основным недостатком данного метода является то, что некоторые виды и даже рода растений имеют сходную морфологию пыльцевых зёрен, что затрудняет точное ботаническое определение источника происхождения мёда. Метабаркодинг (метод, позволяющий по коротким уникальными последовательностям ДНК определять таксономическое положение организма) может решить данную проблему.

Целью настоящей работы являлось сопоставление палинологического метода и метабаркодирования. Для работы в розничной сети были приобретены пять образцов цветочного мёда: подсолнечниковый, «Каштановый горный», два образца липового и «Кавказский горный». Пыльцу отмывали из 50 г мёда при помощи буфера TES (10 мМ Tris-HCl pH=8,0, 2мМ EDTA, 0,5 % SDS (55 °С, 180 мл на указанную массу мёда) с последующей отмывкой тёплой водой. Выделение ДНК проводили СТАВ-методом с незначительными модификациями. Для создания библиотек ДНК-баркодов использовали праймеры для амплификации участка *ITS1* и смесь полимераз Encyclo (Евроген, Россия). Секвенирование проводили на приборе Ion S5 (Thermo Fisher Scientific), библиотеки готовили с помощью набора Ion Xpress Plus Fragment Library Kit методом PCR-free. Для палинологического анализа использовали пыльцу, отмываемую сходным методом из 10 г мёда.

В образце мёда «Каштановый горный» основной пыльцевой тип, а также 22 % прочтений *ITS1* соответствовали растениям рода *Castanea*. Также были обнаружены пыльцевые зёрна (2,5 %) и *ITS1* (42,7 % ридов) *Helianthus*, растений сем. Crucifera (6 % пыльцы / 5,8 % ридов *ITS1 Brassica*), Rosacea

(1 % пыльцы / 1,2 % ридов *ITS1 Rubus*), Fabacea (1 % пыльцы / 13,9 % ридов *ITS1 Melilotus*). Несмотря на наличие в образце пыльцы злаков, их ДНК-баркоды обнаружены не были, но присутствовали *ITS1* родов *Clematis* (2,2 %), *Quercus* (1,3 %) и *Plantago* (1,3 %).

В обоих образцах липового мёда (Hon7 и Hon31) обоими методами были обнаружены *Tillia* и *Filipendula*. Однако и по остальному пыльцевому спектру, и по составу растений, полученному в результате высокопроизводительного секвенирования, эти образцы различались. В образце Hon7 обоими методами также были обнаружены *Helianthus* и другие представители сем. Compositae, представители сем. Cruciferae и Umbelliferae. Также в этом образце были отмечены единичные пыльцевые зёрна культурных злаков и полыни. Однако *ITS1* растений, которые можно отнести к данным группам, обнаружено не было. Во втором образце липового мёда (Hon31) были выявлены злаковые, бобовые и розоцветные, в небольших количествах зонтичные и крестоцветные. При этом в данном образце обнаружено значительное количество пыльцевых зёрен подсолнечника (27 %) и культурных злаков (6 %), тогда как ДНК-баркодов этих растений выявлено не было. С другой стороны, 32 % прочтений *ITS1* относились к *Betula*, а 13,2 % – к клеверу, но пыльцы этих растений в образце обнаружено не было.

В образце подсолнечникового мёда доминирующим, как по прочтениям (38,1 %), так и по пыльце (58,9 %), оказался подсолнечник. В меньшем количестве были обнаружены последовательности *ITS1* крапивы (19,3 %), резеды (8,5) и сорго (6,6 %), но пыльцы первых двух в образце обнаружено не было, а присутствовали единичные пыльцевые зёрна липы и клевера.

Образец мёда, заявленный производителем как «Кавказский горный», содержал большое количество пыльцы (58 %) и 9 % прочтений *ITS1 Helianthus*. Также в этом образце были обнаружены полынь (1 3% пыльцевых зерен / 2,1 % прочтений), пыльца и *ITS1* зонтичных и маревых. Только в пыльцевом анализе была также обнаружена пыльца амброзии (2 %) и культурных злаков (2 %), тогда как только при анализе ДНК-баркодов – разнообразные представители злаковых (в сумме 13,5 %).

Таким образом, совпадение определения ботанического происхождения мёда при анализе образцов двумя различными методами составляет 30–71 % случаев. Мёд «Кавказский горный» представляет собой подсолнечниковый мёд из южных регионов России, возможно и из предгорий Кавказа.

АНАЛИЗ СОРТОВ МАЛИНЫ ПО ГЕНАМ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR МАРКЕРОВ

В.Г. Лебедев^{1,2}, Н.М. Субботина^{1,2}, Е.О. Видягина^{1,2}, К.А. Шестибратов²

¹Пуцинский государственный естественно-научный институт, 142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пуцино, пр. Науки, 3

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пуцино, пр. Науки, 6

Род *Rubus* L. (Rosaceae, Rosoideae) является одним из наиболее разнообразных в растительном мире и включает 600–800 видов, среди которых наибольшее экономическое значение имеют малина красная (*Rubus idaeus* L.), малина чёрная (*R. occidentalis* L.) и ежевика (*Rubus* sp.). Ягоды этих видов полезны для здоровья, так как являются хорошим источником антиоксидантов, включая флавоноиды и антоцианы, содержание которых коррелирует с окраской. Мы оценили генетическое разнообразие сортов малины с различной окраской ягод с помощью микросателлитных (SSR) маркеров на основе структурных и регуляторных генов биосинтеза флавоноидов. Всего 19 сортов малины красной и два сорта малины чёрной были проанализированы 9 маркерами. Наиболее полиморфным оказался маркер RiMY01 из интронной области транскрипционного фактора MYB10. Вариабельность в целом была выше для SSR-маркеров, находящихся в интронах, чем в экзонах. Для некоторых локусов были обнаружены уникальные аллели, позволяющих идентифицировать различных сорта. Оценочные значения ожидаемой гетерозиготности исследуемых локусов варьировались от 0,05 в локусе FaFS02 до 0,84 в локусе RiMY01. Кластерный анализ показал чёткое разделение сортов красной и чёрной

малины, а также выделение части сортов с жёлто-оранжевой окраской ягод в отдельный подкластер. Группирование при этом не было связано с географическим или генетическим происхождением сортов. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методик маркерной селекции малины на содержание биологически активных веществ.

Работы выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 14.574.21.0149, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0149).

АДДИТИВНЫЕ МЕТОДЫ БЫСТРОГО ПРОТОТИПИРОВАНИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ

Д.В. Науменко

*НТЦ «Техноцентр» Южного федерального университета, 347900, Российская Федерация, г. Таганрог,
ул. Шевченко, 2
E-mail: danil.naumenko@gmail.com*

Микрофлюидика – это техническое направление развивающееся в последнее десятилетие. Оно находит широкое применение в биологических и медицинских исследованиях для манипуляций отдельными малыми объектами (клетками, белками); позволяет проводить взаимодействие в малых объемах жидкости, имитировать биологические процессы [1]. Трёхмерная печать представляет собой альтернативу традиционным методам наряду с лазерной обработкой и методами мягкой фотолитографии [2], не только за счёт обеспечения быстрых итераций проектирования на этапе разработки, но и за счёт сокращения расходов, связанных с производственной инфраструктурой, установкой и обслуживанием оборудования. Также полимерные микрожидкостные устройства могут стать связующим звеном между различными лабораторными установками для упрощения и ускорения исследований. Благодаря последним достижениям в технологиях 3D-печати очень сложные микрожидкостные устройства могут быть изготовлены с помощью быстрых и экономичных процедур, что делает микрофлюидику более доступной для учёных и исследователей. В этом обзоре представлен способ применения технологии 3D-печати методом SLA для изготовления мастер-форм для широко распространённой технологии для создания микрофлюидных устройств PDMS (ПДМС), а также изготовления отдельных микрофлюидных компонентов.

3D-принтеры SLA используют ультрафиолетовое излучение для послойного отверждения жидких полимеров, создавая трёхмерные конструкции на базовой платформе. Ультрафиолетовый свет с длиной волны 385–405 нм генерируется с использованием источника ультрафиолетового излучения, в результате формируются жидкокристаллические матрицы для создания растрового рисунка с размером пиксела от 5 мкм и толщиной слоя от 10 мкм для современных образцов трёхмерных принтеров.

Базовой технологией для создания PDMS-устройств является травление структуры на кремниевой пластине с применением технологии фотолитографии. Данная технология требует специально оснащенной лаборатории, оборудования и квалифицированного персонала. Кремниевые мастер-формы возможно заменить на полимерные, полученные методом трёхмерной печати. Само устройство либо его части можно изготовить аддитивным методом, а для уплотнения использовать плоские мягкие силиконовые прокладки. Данный метод схож с методом лазерной полировки [2], но позволяет получать не только выпуклые, но и микроканальные структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Евстратов А.А.* // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Мат-лы IX Междунар. конгр. 2017. С. 342–345.
2. *Посмитная Я.С., Букатин А.С., Макаров Д.А. и др.* // Научное приборостроение. 2017. Т. 27. № 2. С. 13–20.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИННОГО КОМПЛЕКСА CRISPR SpCas9/gRNA У МИКРОВОДОРОСЛИ *Chlamydomonas*

И.А. Сизова¹, В.И. Шалзуев¹, Н.Г. Соболева¹, Р. Hegemann², В.Н. Вербенко¹

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Российская Федерация, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, 1

²Institute of Biology, Humboldt Universität Berlin, D-10115 Berlin, Invalidenstraße, 42

E-Mail: sizova_ia@pnpi.nrcki.ru; irinasiz@yahoo.com

Система CRISPR Cas – мощный инструмент для редактирования геномов. Мы создали протокол сайт-направленной инактивации генов, не имеющих селективируемого фенотипа, у одноклеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas*, основанный на электропорации в клетки рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR SpCas9/gRNA в сопровождении маркерной плазмиды и донорной ДНК. Маркерная плаزمида (pPmR/pHgR) необходима для предварительной селекции трансформантов, а донорная ДНК служит шаблоном для копирования и внедрения по сайту расщепления стоп-кодонов и олигонуклеотида, который требуется для отжига праймера при ПЦР-скрининге мутантных клонов. Максимальное количество мутантов удаётся получить при использовании донорной ДНК, представляющей смесь комплементарных одноцепочечных (оц) олигонуклеотидов (обозначена ssOligofw+ssOligorev) с длиной гомологии по гену-мишени 60 нуклеотидов, которые защищены по концам фосфотиоатными группами или с плазмидной ДНК. Мутантные клоны составляли 3–20 % от количества случайно выбранных преселектированных клонов. С использованием этого протокола мы инактивировали более 25 ядерных генов у различных штаммов водоросли. Секвенирование показало, что точное копирование внесённого ДНК-шаблона наблюдается только у 10–20 % мутантных клеток, так как гомологичная репарация двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР), создаваемых SpCas9/gRNA, обычно сопровождается дополнительными преобразованиями гена-мишени.

Для структурно-функционального изучения белков в клетках *Chlamydomonas* необходимы штаммы, содержащие определённые белковые модификации – точные аминокислотные замены, корректно встроенные флуоресцентные зонды и таги. Один из подходов для увеличения количества предопределённых мутантов основан на манипуляциях с генами репарации ДЦР. Как известно, ДЦР могут быть восстановлены с помощью точной гомологичной рекомбинации и часто ошибочных процессов – классического негомологичного соединения концов (c-NHEJ), ключевыми факторами которого являются белки KU80, KU70 и альтернативного соединения концов (alt-EJ), важнейшим белком которого является ДНК полимеразы POLQ. Обнаружено, что в клетках эукариот инактивация генов, кодирующих белки c-NHEJ и/или alt-EJ, может изменить спектр SpCas9/gRNA-индуцированных мутаций и часто увеличивает количество гомологичных рекомбинантов, содержащих предсказанные генные модификации. Перед нами стояла задача выяснить роль белков Ku80, Ku70 и POLQ в репарации SpCas9/gRNA-индуцированных ДЦР у *Chlamydomonas*. Мы приготовили мутанты *ku80*, *ku70* и *polQ* штамма CC3403-D5, содержащего дефектный ген устойчивости к паромомицину (Pm) *aphVIII*, и штамма дикого типа CC125 и использовали их в качестве реципиентов при проведении экспериментов по сайт-направленному мутагенезу. Эффективность гомологичной репарации оценивали по количеству устойчивых к Pm рекомбинантов штамма CC3403-D5, а негомологичного и/или альтернативного соединения концов – путём фенотипического скрининга мутантов, дефектных по гену *SNRK2.2* штамма CC125. Полученные результаты показали, что инактивация генов *KU80*, *KU70* оказывает весьма слабое влияние на эффективность сайт-направленной модификации генов *aphVIII* и *SNRK2.2*, а также на спектр мутаций гена *snrk2.2*, индуцированных действием SpCas9/gRNA, по сравнению с диким типом. Некоторая стимуляция генного таргетинга у мутантов *ku80*, *ku70* отмечена только при использовании в качестве донорной ДНК индивидуальных оц-олигонуклеотидов ssOligofw или ssOligorev – неэффективных шаблонных ДНК для клеток дикого типа. Инактивация гена *POLQ*, напротив, резко

подавляла интеграцию маркерной плазмиды в случайные точки генома, а также сайт-направленную модификации генов с использованием донорных оц-олигонуклеотидов ssOligofw+ssOligorev. У мутанта *polQ* репарация гена *aphVIII* происходила только посредством гомологичной рекомбинации с донорной плазмидой *pdelAPH*, содержащей протяжённую гомологию с геном-мишенью. Следует отметить, что в клетках штамма CC3403-D5 гомологичная репарация гена *aphVIII* с использованием донорной плазмиды *pdelAPH* происходила в 30 раз эффективнее, по-видимому, за счет активности POLQ. Таким образом, у *Chlamydomonas* при сайт-направленном мутагенезе с использованием системы CRISPR Cas главным белком, ответственным за копирование ДНК-шаблонов и репарацию ДЦР, является ДНК-полимераза POLQ – фермент, для активности которого достаточна микрогомология длиной 3–4 нуклеотида. Инактивация генов *KU80* и *KU70* не повышает эффективность и точность гомологичной репарации ДЦР, внесенных SpCas9/gRNA. Полученные результаты открывают перспективы направленного редактирования ядерного генома *Chlamydomonas*, что необходимо для фундаментальных и прикладных исследований и создания биотехнологических штаммов с новыми свойствами.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОСТАВА МОНОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЯНОСТЕЙ, ЗАЯВЛЕННЫХ КАК “КРАСНЫЙ ПЕРЕЦ”, “ПАПРИКА” (*Capsicum* sp.) С ПОМОЩЬЮ NGS

**С.О. Синицын¹, А.Е. Самойлов², А.А. Криницына³, Е.В. Корнеенко², А.А. Касьянов⁴,
М.Д. Логачёва^{5,6}, А.С. Сперанская^{2,3}**

¹Московский физико-технический институт, 141701, Российская Федерация, Московская обл., г. Долгопрудный Институтский пер. 9

²Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, 111123, Российская Федерация, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а,

³Московский государственный университет, 119991, Российская Федерация, г. Москва, GSP-1, Ленинские горы, 1/12

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Губкина, 3

⁵Институт проблем передачи информации, 127051, Российская Федерация, г. Москва, Большой каретный пер. 19, стр. 1

⁶Сколковский институт науки и технологий, 143026, Российская Федерация, г. Москва, ул. Нобеля 3
E-mail: sinitsyn.so@phystech.edu; andrei.samoilov@gmail.com; krinitsina@msu-botany.ru; lennatta@yandex.ru; artem.kasianov@gmail.com; maria.log@gmail.com; hanna.s.939@gmail.com

В качестве пряностей под названием “перец” используют растения, относящиеся к разным видам. Наиболее распространены чёрный перец (род *Piper*, Piperaceae), сладкий, красный, а также перец чили (род *Capsicum*, Solanaceae) и душистый перец (роды *Pimenta*, Myrtaceae). Ранее мы проанализировали многокомпонентные специи, содержащие, наряду с другими растительными компонентами, *Piper* и *Capsicum*, методом NGS-анализа ДНК-штрихкодов и обнаружили, что представители этих родов часто не идентифицируются или обнаруживаются в следовых количества [1]. Наряду с возможной фальсификацией, этот факт может объясняться тем, что перец обладает ярко выраженным вкусом, в связи с чем производители могут добавлять его в смеси лишь в малых количествах (ниже предела чувствительности метода).

В настоящей работе проанализированы образцы монокомпонентных специй из растений рода *Capsicum* от разных производителей. Два образца, “per1” и “per2” были куплены у частных розничных торговцев на “общественных рынках” (от неизвестных производителей). Прочие были приобретены в розничных магазинах: два относились к распространённой в РФ марке “К” (образцы “per3” и “per4”), третий – от производителя “ВВ” (образец “per5”). Идентификацию состава растительных компонентов

проводили с помощью амплификации и последующего высокопроизводительного секвенирования фрагментов ядерного генома *nrITS1* и *nrITS2*. Для подготовки библиотек использовали двухэтапный метод ПЦР, протокол описан в работе [2]. Секвенирование проводили на Illumina MiSeq (PE 300+300 циклов). Полученные результаты проанализированы способом, подробно описанным в [2]. Для положительной идентификации пороговым значением считали 1 % или более от общего количества прочтений.

Для каждого из анализируемых образцов после фильтрации по качеству было получено ~19,9–141 тыс. парноконцевых прочтений. В трёх из пяти образцов процентное содержание прочтений, относящихся к роду *Capsicum*, было высоким (87–97 %), тогда как в двух других – либо крайне малым (0,4 %, ниже порогового значения), либо они совсем отсутствовали (табл.).

Таблица

Результаты анализа образцов монокомпонентных специй из растений рода *Capsicum* от разных производителей

Марка товара	Название образца	Состав, согласно надписи на упаковке	Кол-во ридов	Идентифицированный состав						
				лат. род	комментарий	ридов, %				
рынок	per1	Перец красный молотый (без надписи, со слов продавца)	56478	Capsicum	Перец	0,00				
				<i>Triticum</i>	Пшеница	87,00				
				<i>Secale</i>	Рожь	9,50				
				<i>Convolvulus</i>	Вьюнок (сорн)	2,50				
				Прочее		1,00				
рынок	per2	Перец острый красный молотый (без надписи, со слов продавца)	111531	Capsicum	Перец	96,20				
				<i>Triticum</i>	Пшеница	1,00				
				Прочее		2,80				
				марка «К»	per3	Чили кайенский перец. <i>Может содержать примеси глютеносодержащих злаков, яиц, сои, сельдерея, кунжута, орехов, молока, горчицы</i>	19913	Capsicum	Перец	97,10
								<i>Convolvulus</i>	Вьюнок (сорн)	1,00
Прочее		1,80								
марка «К»	per4	Паприка молотая. <i>Может содержать примеси глютеносодержащих злаков, яиц, сои, сельдерея, кунжута, орехов, молока, горчицы</i>	141461					Capsicum	Перец	0,40
								<i>Panicum</i>	Просо	49,70
				<i>Brassica</i>	Горчица сарептская (или черная)	37,20				
				<i>Echinochloa</i>	Ежовник (сорн)	4,40				
				<i>Sinapis</i>	Горчица белая	2,00				
				<i>Oryza</i>	Рис	1,50				
				Прочее		4,80				
марка «ВВ»	per5	Паприка молотая	61655	Capsicum	Перец	84,50				
				<i>Triticum</i>	Пшеница	3,90				
				<i>Sageretia</i>	Сагеретия, (Китай, декоративн)	3,10				
				<i>Mutisia</i>	Мутизия (Ю.Америка)	2,00				
				<i>Salvia</i>	Шалфей	1,40				
				Прочее		5,10				

Несоответствие спектра ДНК-штрихкодов ожидаемому составу обнаружили в образцах, купленных как на рынке, так и в магазине. А именно: в образце “per1” были выявлены, в основном, ДНК-штрихкоды хлебных злаков, пшеницы и ржи (в сумме 96,5 % прочтений), в образце “per4” – проса и возможно сарептской (*Brassica juncea*) или черной (*B. nigra*) горчицы (в сумме 86,9 % прочтений). На приправах марки “К” было указано, что продукты потенциально могут содержать следовые количества иных ингредиентов, в частности горчицы, однако к роду *Brassica* относилось более трети (37,2 %)

найденных прочтений. Возможно, отсутствие прочтений *Capsicum* является следствием деградации ДНК этого растения вследствие обработки (например, термической). Следует отметить, что прочтения пшеницы были найдены, в том числе, в образце “пер5” от производителя, позиционирующего свои товары как “здоровое питание” (на упаковке отсутствовало предупреждение о возможной контаминации).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Omelchenko D.O., Speranskaya A.S., Ayuginin A.A. et al. // Genes (Basel). 2019. Feb. Vol. 10 (2). P. 122. Doi: 10.3390/genes10020122.*
2. *Speranskaya A.S., Khafizov K., Ayuginin A.A. // Food Control. 2018. Vol. 93. P. 315–324. Doi: 10.1016/j.foodcont.2018.04.040.*

ОДИН ИЗ ПОДХОДОВ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

***А.О. Ситковская¹, Е.Ю. Златник¹, И.В. Межевова¹, Е.С. Бондаренко¹, С.А. Колпаков²,
Е.П. Колпакова², И.А. Новикова¹***

¹*Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-линия, 63*

²*Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, 344000, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119
E-mail: grankina.anastasia@mail.ru*

В последнее время большое внимание уделяется иммунной системе онкологических больных и её активации с помощью биологической терапии. Существует предположение, что биологические методы лечения, включая иммунотерапию и терапию онколитическими вирусами (ОВ), являются более физиологичными и хорошо переносимыми, чем химиолучевая терапия. Применение онколитических вирусов (ОВ) – перспективный метод ингибирования опухолевого роста. ОВ оказывают как прямое противоопухолевое, так и косвенное иммуностимулирующее действие. Известно, что при онкологических патологиях нарушено распознавание опухолевого антигена клетками иммунной системы. Стимуляция дендритных клеток (ДК) под действием опухолевых антигенов совместно с вирусами возможно усилит генерацию антиген-специфических лимфоцитов против опухолевых клеток, которые в свою очередь могут быть эффективным инструментом противоопухолевых клеточных технологий.

Цель настоящей работы заключалась в выяснении возможности использования реовируса штамма Р-92 для генерации опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro*.

Работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, протокол № 33/1 от 29.11.2018г. Доноры подписывали информированное согласие. Исследовали эффективность нагрузки незрелых дендритных клеток (ДК) онколитическим реовирусом человека Р-92 (предположительно 3-го серотипа). Из моноцитов крови здоровых доноров генерировали незрелые дендритные клетки (ДК). Для созревания ДК применяли три вида антигенной нагрузки: только лизат культуры клеток HeLa (культура клеток рака шейки матки); реовирус совместно с лизатом клеток HeLa, полученный в результате лизирования реовирусом клеток HeLa при совместном культивировании; только реовирус, культивируемый в стандартной культуре клеток СПЭВ (культура клеток почки эмбриона свиньи). Далее проводили сокультивирование ДК, аутологических лимфоцитов и клеток HeLa.

Нами установлено, что при дифференцировке ДК в присутствии реовируса Р-92 увеличивается доля зрелых (CD83⁺ – 96, 3% при нагрузке ДК реовирусом и HeLa; – 98,1 % при нагрузке ДК реовирусом) и активированных ДК (CD86⁺/HLA-DR⁺ – 68,9 % при нагрузке ДК реовирусом и HeLa; – 62,4 % при нагрузке ДК реовирусом) по сравнению с контролем (CD83⁺ – 88,7 %; CD86⁺/HLA-DR⁺ – 25,5 %). Помимо этого, образец ДК с нагрузкой антигенами HeLa после сокультивирования с лимфоцитами и культурой HeLa не показал активного цитолитического действия, наблюдали лишь цитостатический эффект, в отличие от образцов с добавленным реовирусом Р-92.

Таким образом, антиген, представляющий собой культуру клеток HeLa, культивируемую с реовирусом Р-92 в описанных нами условиях, можно предложить в качестве эффективного экспериментального продукта для клеточной иммунотерапии опухолей.

СОЗДАНИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АРКТИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

К.М. Степанов^{1,3}, С.И. Семенов²

¹Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, 677010, Российская Федерация, г. Якутск, Сергеляхское ш., 4

²Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, 677009, Российская Федерация, г. Якутск, ул. Строителей, 8

³Якутская государственная сельскохозяйственная академия, 677007, Российская Федерация, г. Якутск, Сергеляхское ш., 3 км, д. 3

E-mail: Stenko07@mail.ru; insemenov@yandex.ru

Молекулярно-генетические исследования вирусов гепатитов В, С и D, выделенных у больных вирусными гепатитами из Республики Саха (Якутия) показали разнообразие генетических вариантов всех выделенных вирусов гепатитов.

Анализ заболеваемости вирусными гепатитами (ВГ), по данным серологических исследований, выявил высокую интенсивности течения эпидемического процесса среди населения Республики Саха (Якутия). Анализ представленных исследований показал, что среди населения республики имеет место высокая доля серопозитивных лиц по всем вирусным гепатитам с максимальными показателями гепатита С в группе условно-здоровых лиц (23,2 %), гепатита В (20,2 %), гепатита Е (21,2 %). Настораживает высокое инфицирование HBsAg-позитивных лиц маркерами вируса гепатита D (30 %). Сообщается о существовании большого количества генетических вариаций изолятов HEV.

Между тем нельзя исключить, что высокий уровень хронизации определяется особенностями северных условий – спецификой питания, недостаточной обеспеченностью организма витаминами, экстремальными климатическими условиями и особенностью иммунного ответа на HBV-инфекцию. С другой стороны, заболеваемость ВГ зависит и от состояния экономики страны в целом, региона в частности: резкое изменение социально-экономических условий труда и быта; чрезмерная коммерциализация медицинской помощи населения.

Фактор питания имеет большое значение в лечении острых форм вирусных гепатитов и является основой базовой терапии. У народов Севера изначально был сформулирован белково-липидный тип обмена, который в изменённых условиях социально-экономического развития общества был трансформирован в углеводно-белковый тип обмена (европейский). Основным требованием диетического питания при вирусных гепатитах являются легкоусвояемость пищевых продуктов. Лёгкая усвояемость оленины по сравнению с другими видами мяса, позволяет рекомендовать её при острых и хронических формах вирусного гепатита. Быстрая перевариваемость рыбных белков поможет врачу рекомендовать различные виды рыбы как диетическое средство при лечении острых форм гепатита.

Питание при остром гепатите должно быть насыщено нормальным количеством белков (100 г) и повышенным – углеводов (450–500 г); умеренно ограничиваются жиры (60–100 г). Количество витаминов должно быть повышено: витамина С – до 250–300 мг, витамина В₁₂ – 0,006–0,001 мг, тиамин, рибофлавин, пиридоксин – до 8–10 мг, никотиновой кислоты – до 60 мг; несколько ограничивается количество поваренной соли (8–9 г).

Лечебное питание при заболеваниях печени и желчного пузыря предусматривает влияние на нарушенные процессы обмена веществ, создание благоприятных условий для функциональной

деятельности и восстановления структуры печени, улучшение процессов пищеварения и в том числе желчевыделения.

Эти предпосылки обосновывают необходимость обеспечения больного достаточным количеством полноценного белка с правильным соотношением животного и растительного белка.

Необходима также сбалансированность аминокислотного состава рациона. Диета должна содержать 80–90 г белка. Белок ограничивается при тяжёлой гепатобилиарной недостаточности (декомпенсация функциональной способности печени, нарушение процессов дезаминирования, снижение способности к мочевинообразованию, угрожающая кома) и увеличивается (до 110–120 г) при гепатозе у истощённых лиц.

У большинства больных содержание жиров в диете соответствует физиологической норме (80–90 г), причём 2/3 должны составлять жиры животного происхождения и 1/3 – растительного. Введение достаточного количества жира при адекватных количествах белка повышает вкусовые качества пищи и насыщаемость.

Гиповитаминозы при заболеваниях печени могут возникнуть вследствие нерационально составленных диет, нарушения процессов пищеварения и всасывания в кишечнике, нарушения в процессах биологического активирования витаминов – превращения их в коферментные (фосфорилирование) и ферментные (протеидизация) формы.

При заболевании печени целесообразно создать и поддерживать «избыточный» фон витаминов, что достигается с помощью дополнительного приёма препаратов витаминов.

В связи с вышеизложенным разработка и практическая реализация технологии специализированного продукта для питания больных заболеваниями печени, учитывающего особенности традиционного питания и поддерживающего его нутритивный статус, является актуальной задачей и требует объективного научного обоснования принципов их создания.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-415-140005 p_a

ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕМЕНТ-СОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПАТОГЕНЫ РАСТЕНИЙ

О.М. Цивилева¹, А.И. Перфильева², А.Г. Павлова²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 410049, Российская Федерация, г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Российская Федерация, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132

E-mail: tsivileva@ibppm.ru; alla.light@mail.ru; pavlovaantonina2013@yandex.ru

В настоящее время актуально развитие инновационных методов на базе «зелёных» биотехнологий лекарственной макромицетной флоры, связанное с разработкой наноструктурированных материалов для создания эффективных функциональных молекулярных структур.

Высшие грибы – продуценты уникального комплекса биологически активных веществ, источник агентов с антибактериальными свойствами. Актуальным является поиск индукторов повышения уровня антимикробных субстанций в культурах съедобных грибах.

В работе получены селен- или биометалл-содержащие биокомпозиты из ряда лекарственных базидиомицетов, новые данные об антибактериальных свойствах полимерных субстанций биологического происхождения. Выявлен эффект подавления роста бактериальных фитопатогенов пяти родов под влиянием указанных полимерных композитов грибного происхождения. Показано снижение жизнеспособности бактериальных клеток в результате инкубации с биокомпозитами элементного Se [1], Cu(II), Fe(II), Zn(II), Co(II) [2]. Элемент-содержащие биокомпозиты, в сравнении

с биополимерными субстанциями, полученными из того же гриба, обладали существенно более выраженным антимикробным эффектом с явными видоспецифическими особенностями проявления.

Исследование характеристик и свойств субмикрокомпозитов металлов и селена, синтезированных биологическим методом, является предпосылкой вовлечения полученных данных в перспективный процесс разработки лекарственных форм и промышленных полупродуктов. Микосинтез антимикробных агентов имеет перспективу содействия решению проблемы поиска антибиотиков нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tsivileva O.M., Perfilova A.I.* // Current Nutrition & Food Science. 2017. Vol. 13(2). P. 82–96. Doi: 10.2174/1573401313666170117144547.
2. *Tsivileva O.M. et al.* // Biomics. 2018. Vol. 10 (2). P. 210–213. Doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-30.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ Tet3 НА ХАРАКТЕР ОБРАЗОВАНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДНК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕК293Т

В.К. Чмыхало¹, Т.П. Шкурат¹, А.А. Александрова¹

*¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: vkchmykhalo@icloud.com; tshkurat@yandex.ru; aalexsandrova@mail.ru*

Ведущую роль в процессах активного деметилирования у млекопитающих играют представители семейства диоксигеназ Tet, открытие которых позволило сделать значительный прорыв в понимании эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов [1]. Каталитическая активность белков Tet заключается в последовательном окислении метильной группы у 5-метилцитозина, протекающем с формированием 5-гидроксиметилцитозин (5-гмЦ), 5-формилцитозин (5-фЦ) и 5-карбокситозин (5-каЦ). У человека и у мыши семейство белков Tet представлено тремя генами – *TET1*, *TET2* и *TET3*. Ген *TET3* кодирует и у человека, и у мыши три различные изоформы – полноразмерную Tet3FL, ооцит-специфическую Tet3OO и короткую Tet3s. Особенности вклада каждой изоформы в процессы образования окисленных производных 5-метилцитозина недостаточно изучены и требуют детального анализа для лучшего понимания процессов деметилирования у млекопитающих [2]. Поэтому целью работы стало исследование влияния экспрессии различных изоформ Tet3 на образование окисленных производных 5-метилцитозина в культуре клеток НЕК293Т.

Объектом данного исследования являлись изоформы белка Tet3 мыши. Для изучения влияния сверхэкспрессии изоформ Tet3 на характер образования модификаций ДНК в культуре клеток человека были разработаны генетические конструкции на базе вектора рMJ920T2AGFP и синтезированы методом молекулярного клонирования последовательностей независимо от лигирования In-Fusion. Полученные векторы верифицировались с помощью рестрикционного анализа и секвенирования. Культура клеток НЕК293Т подвергалась трансфекции данными векторами с использованием коммерческого набора Lipofectamine 2000. Для установления характера распределения 5-гмЦ, 5-фЦ и 5-каЦ производилось иммуноцитохимическое окрашивание трансфицированных клеток с последующим микроскопированием. Анализ изображений полученных образцов производился в ПО Zeiss и Fiji, результаты обрабатывались адекватными для характера распределения данных параметрическими и непараметрическими критериями.

Согласно результатам иммуноцитохимического исследования, в клетках линии НЕК293Т сверхэкспрессия короткой изоформы Tet3s и ооцит-специфической изоформы Tet3OO приводит к статистически значимому* возрастанию уровня 5-гмЦ ($p < 0,001$ и $p = 0,001$, соответственно). В то же время при сверхэкспрессии полноразмерной изоформы Tet3FL изменение уровня 5-гмЦ статистически незначимо (рис.).

* Значимые отличия есть при уровне значимости по критерию Манна-Уитни $< 0,001$ и $0,042$, соответственно.

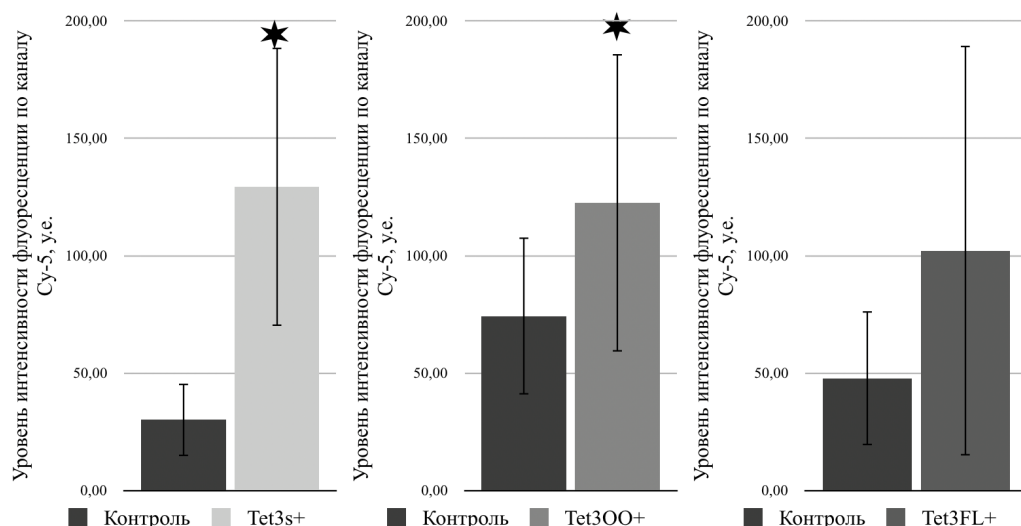


Рис. Влияние сверхэкспрессии изоформ Tet3 на уровень 5-гмЦ в клетках HEK293T

Возможно не все изоформы Tet3 способны осуществлять первую ступень окисления 5-мЦ. Детекция 5-фЦ в клетках HEK293T наблюдается при сверхэкспрессии изоформ Tet3FL и Tet3OO и не происходит при сверхэкспрессии Tet3s. Вероятно, это означает, что Tet3s имеет слабую способность распознавать и окислять 5-гмЦ до 5-фЦ. Согласно результатам микрокопирования, 5-каЦ обнаруживается во всех успешно трансфицированных клетках. Вероятно, все изоформы имеют одинаковую способность формировать 5-каЦ, и эффективность окисления 5-фЦ до 5-каЦ зависит от самого каталитического домена в структуре Tet3.

Суммируя вышеизложенное, можно говорить о том, что вклад каждой изоформы Tet3 неравнозначен на разных ступенях окисления 5-метилцитозина. Возможно таким образом функциональная дифференциация изоформ Tet3 оказывает влияние на эпигенетический ландшафт клетки и последующую экспрессию генов, являясь дополнительной ветвью регуляции состояния эпигенома у млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Langemeijer S.M., Aslanyan M.G., Jansen J.H. // Cell Cycle. 2009. Vol. 8. P. 4044–4048.
2. Lepikhov K., Arand J., Fuchs S. et al. // Epigenetics and Human Health. 2015. Vol.4. P. 69–99.

Работа выполнена благодаря программе Erasmus+ в университете земли Саар, Саарбрюкен, Германия, выражаем благодарность проф. Д.Е. Вальтеру и К.А. Лепихову

5-АЛК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ГЛИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

***Т.В. Шамова, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, И.В., Межевова, С.Ю. Филиппова,
О.В. Нистратова, Н.С. Карнаухов, Н.С. Кузнецова***

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-линия, 63
E-mail: tanyshamova@mail.ru

Целью исследования было изучение эффективности применения 5-АЛК для получения жизнеспособной ткани глиальных опухолей и возможности дальнейшего культивирования дезагрегированного материала *in vitro*.

В качестве материала использовали первичную опухолевую ткань, полученную во время операции под визуальным контролем с применением 5-АЛК, которая принималась пациентами перорально за 2 ч до оперативного вмешательства (Аласенс®, ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия). Изымаемый в процессе операции материал отделялся от зон некроза методом диссекции под визуальным флуоресцентным контролем. Дезагрегацию материала проводили на BD Medimachine (Becton Dickinson, США). Из образцов опухоли размером 0,3 см³ получали 2–4·10⁶ клеток. Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12 с L-глутамином (Gibco, Life Technologies Ltd, UK) с добавлением 10 %-ной телячьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия), 1 % незаменимых аминокислот (NEAA, MEM Non-essential Amino Acid Solution (100×), Sigma-Aldrich, Германия) и 0,5 %-го пенициллина-стрептомицина (Биолот, Россия). Окрашивание цитологических препаратов проводили по Паппенгейму. Образцы для иммуноцитохимического исследования, включающего анализ экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и маркера пролиферативной активности (Ki-67), в виде покровных стёкол с монослоем клеток окрашивали гематоксилином, обезвоживали и заключали в среде BioMount (Bio Optica, Италия). Визуализацию образцов осуществляли на микроскопе Axio Imager с использованием объективов x20, x40 (Zeiss, Германия).

Начиная с первого пассажа, наблюдалось набухание клеток и появление морфологических особенностей, характерных для клеточных линий *in vitro*. После пятого пассажа скорость роста культур сократилась. К восьмому пассажу отмечалось формирование массивных клеточных отростков, не позволявших идентифицировать отдельные клетки при световой микроскопии. Вследствие этого исследование проводилось с использованием фазового контраста. При этом митозов не наблюдалось, о чём также свидетельствует неизменность pH в питательной среде. В течение восьми пассажей не наблюдалось никаких видимых признаков неспецифической дегенерации. Для клеток первичной глиобластомы отмечалась более низкая скорость роста в сравнении с клетками анапластической астроцитомы.

Цитологический анализ препаратов анапластической астроцитомы показал наличие отдельно расположенных клеток и их комплексов, имеющих переменный размер и содержащих интенсивно окрашенные апикально сдвинутые полиморфные ядра с 1–5 ядрышками и глыбчатой структурой хроматина. Цитоплазма клеток базофильная, с размытыми краями; присутствуют липидные вакуоли и внутрицитоплазматическое аксофильное вещество. В препаратах, подготовленных на стадии восьмого пассажа, наблюдались изменения: появилась переменность размеров ядер, ядрышки стали более выраженными. Встречались «голые» ядра. Митотическая активность присутствовала в 5 % клеток. Отмечалась выраженная анаплазия клеток. Цитологическая картина клеток первичной культуры глиобластомы была аналогичной, за исключением менее выраженной анаплазии.

Иммуноцитохимическое исследование показало «плёночное» распластывание клеток с визуально не четко отграниченными отростками, что нетипично для перевиваемых клеточных линий. Маркер GFAP показал резко выраженную ядерно-цитоплазматическую реакцию, в отдельных очагах отчётливо визуализировалась положительная экспрессия антитела на клеточных отростках звёздчатой формы, что является морфологической особенностью астроцитарных опухолей. Индекс мечения Ki-67 – 60–70 %.

По литературным данным, удержание протопорфирина в опухолевых клетках продолжается всего в течение нескольких часов, что не должно оказывать угнетающего воздействия на клетки. Это было показано в нашем исследовании. Отмечалась более высокая пролиферативная активность клеток анапластической астроцитомы в сравнении с первичной глиобластомой.

После восьмого пассажа наблюдалось угнетение скорости роста культур, что не связывалось с эффектом воздействия 5-АЛК, так как подобное явление характерно для первичных клеточных линий.

Таким образом, использование послеоперационного материала низкодифференцированных астроцитарных опухолей, полученного под визуальным флуоресцентным контролем с применением 5-АЛК, является эффективным для создания первичных клеточных линий, так как позволяет отбирать материал с жизнеспособными клетками. Показано, что накопление протопорфирина в опухолевых клетках не препятствует их переводу в культуру.

МЕТОДЫ СОВРЕМЕННОЙ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕРНОВОГО СОРГО

Л.А. Эльконин¹, В.М. Панин¹, О.А. Кенжегулов¹, Г.А. Геращенко²

¹Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, 410010, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7

²Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, 450054, Российская Федерация, г. Уфа, пр. 60-летия Октября, 71

E-mail: lalkonin@gmail.com

Сорго относится к числу наиболее урожайных и засухоустойчивых злаковых культур, пригодных для возделывания в регионах, подвергающихся действию засухи. Зерно сорго не содержит белков клейковины, а потому пищевые продукты из него могут использоваться для питания людей, больных целиакией, вынужденных соблюдать безглютениновую диету. Однако вследствие устойчивости запасных белков сорго к протеолитическому расщеплению, а также низкого содержания ценных аминокислот – лизина, треонина, триптофана – сорго, имеет более низкую питательную ценность, по сравнению с другими зерновыми культурами.

Считается, что одной из причин более низкой питательной ценности зерна сорго является устойчивость одного из запасных белков, γ -кафирина, располагающегося в периферийном слое белковых телец клеток эндосперма, к расщеплению протеазами. Задачи по подавлению синтеза γ -кафирина, изменению состава протеома зерна сорго могут быть осуществлены посредством разных генетических подходов: экспериментальной индукции мутантов с нарушенным синтезом или изменённым аминокислотным составом кафиринов; выявления существующих в природе аллельных вариантов кафиринов; введения генетических конструкций, вызывающих сайленсинг генов кафиринов; редактирования нуклеотидных последовательностей генов γ - и/или α -кафиринов с целью их нокаута.

Нами были получены трансгенные растения сорго, несущие генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина, с более высокой по сравнению с исходной нетрансгенной линией перевариваемостью запасных белков: у трансгенных растений из поколения T_3 количество нерасщепившегося белка было в 2,9–3,2 раза меньше, чем у растений исходной нетрансгенной линии, при этом показатель перевариваемости достигал 85–92 %, по сравнению с 59–60 % у исходной линии [1]. Введённая генетическая конструкция наследуется при самоопылении трансгенных растений вплоть до поколения T_5 .

Известно, что следствием сайленсинга генов проламинов у злаков является изменение текстуры эндосперма, который утрачивает стекловидный слой и становится мучнистым. Вместе с тем наличие мучнистого эндосперма является недостатком этих линий, поскольку отсутствие стекловидного слоя увеличивает хрупкость зерновок и снижает их устойчивость к повреждению грибковыми заболеваниями. Примечательно, что трансгенные растения, полученные в наших экспериментах, имеют зерновки, как с мучнистым или модифицированным типом эндосперма, так и с нормальным стекловидным эндоспермом. В зерновках с модифицированным типом эндосперма стекловидный слой значительно уменьшен и развивается в виде секторов или пятен, окружённых мучнистым эндоспермом.

Важным следствием сайленсинга генов проламинов у злаков является перебалансировка протеома зерновок, усиление синтеза других белков, в том числе с более высоким содержанием незаменимых аминокислот, лизина и треонина. У полученных нами трансгенных растений относительное содержание двух основных незаменимых аминокислот, лизина и треонина, значительно возросло: доля лизина увеличилась в 1,6–1,7 раза: с 1,5 % от общего содержания аминокислот в муке исходной нетрансгенной линии до 2,4–2,6 % в трансгенных растениях [1].

Примечательно, что у полученных нами трансгенных растений с улучшенной перевариваемостью, несущих генетическую конструкцию для сайленсинга, *nos*-промотор, управлявший в конструкции маркерным геном *bar*, отсутствует. Фактически эти растения являются функционально безмаркерными. Данный факт может быть следствием либо генетической рекомбинации, либо разрушения конструкции

в геноме трансгенных растений. Возможно мы сталкиваемся в данном случае с иммунным ответом генома на наличие чужеродной генетической конструкции.

Следует отметить, что генетическая конструкция для сайленсинга гена γ -кафирина, введенная нами в геном сорго, функционировала нерегулярно, её экспрессия сильно зависела от условий внешней среды и нередко различалась в разных побегах одного и того же растения. В этой связи индукция мутаций непосредственно в генах, кодирующих синтез кафиринов, может быть более эффективным подходом для изменения уровня кафиринов и повышения питательной ценности зерна сорго. Нами начата работа по редактированию нуклеотидных последовательностей генов γ - и α -кафиринов; созданы генетические конструкции для получения линий сорго с полным или частичным нокаутом этих генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В., Доманина И.В. и др. // Физиология растений, 2016. № 5. С. 721–734.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 19-016-00117.

МЕТАГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВ НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ПЕДОГЕНЕЗА

*Е. Абакумов, Е. Иванова, А. Кимеклис, Г. Гладков, А. Зверев,
Е. Першина, Е. Андронов*

Санкт-Петербургский государственный университет, 199178, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, 16-я линия В.О., 29

E-mail: e_abakumov@mail.ru; e.abakumov@spbu.ru

В инвариантных сукцессиях почвенно-растительного покрова проведены лабораторные метагеномные исследования почв, формирующихся в инвариантных моделях экогенеза различных природных зонах Русской равнины. Полевые исследования проведены на следующих объектах: Ленинградская область (серия карьеров по добыче известняков четвертичного происхождения с почвами возрастом от 1 до 70 лет и отбор фоновой дерново-карбонатной почвы); почвы хроносерии валов Юго-Восточного Приладожья (территория Нижнесвицкого заповедника) – возраст объектов от 70 до 5000 лет; Ямало-Ненецкий Автономный округ (окрестности г. Надым – лесотундровые ландшафты, нарушенные карьерными выработками по добыче песков и барханы тундровых песков, переотлагающиеся и не подверженные самозарастанию без рекультивационных практик); кроме того, изучена хроносерия почв, формирующихся на карбонатных щебнистых породах в р. Крым (лесостепное предгорье), а также почвы на отвалах карьеров по добыче глин и песков в окрестностях г. Симферополь и субтропические фоновые и нарушенные открытыми горными разработками почвы и экосистемы в р-не. Никитского ботанического сада.

В ходе метагеномного секвенирования ДНК почвенных объектов и изучения параметров альфа- и бетаразнообразия почвенного микробиома в регенерационных моделях почвообразования получены следующие результаты. Определены маркеры микробиологической эволюции эмбриоподзолов и подзолов на ранних стадиях развития на примере хроносерии карьера по добыче песчано-гравийных материалов в Ленинградской области. Установлена корреляция таксономического состава микробиомов почв различного возраста с вертикальной дифференциацией экологических ниш, в целом, соответствующих различными типами почвенных генетических горизонтов. Установлены параметры микробиома позднеголоценовой хроносерии развития подзолов от эмбриональной (70 лет) до климаксовой (1590 лет) стадии, а также последующими изменениями в почвенном профиле, связанными с увеличением гидроморфизма и признаками вторичной демутиации. Было показано, что наибольшими значениями биомассы бактерий и грибов (по данным ПЦР в реальном времени) отличались органогенные горизонты. При этом на всех стадиях количество микроорганизмов закономерно уменьшалось при движении вглубь почвенного профиля. Был проведен количественный и качественный анализ структуры микробиомов в почвах в р. Крым. Установлено, что таксономическое разнообразие сообществ коррелирует с данными количественной ПЦР: наименьшим разнообразием характеризуются образцы почвы карьеров по добыче глины, максимальным – почвы, где в качестве основы для почвообразовательного процесса выступает известняк. Проведенные исследования микробиома постпирогенных почв свидетельствуют об увеличении доли таксонов ассоциированных с деградацией веществ, образующихся после горения. Проведены исследования таксономической структуры микробиомов почв карьерно-отвальных комплексов в р-не г. Якутска. Установлено, что в составе микробиомов доминировали альфапротеобактерии рода *Sphingomonas* и *Bradyrhizobium*, а также семейства Chitinophagaceae (Bacteroidetes) и рода *Candidatus Udaeobacter* (Verrucomicrobia). Вероятно,

обилие бактерий группы *Bacteroidetes* связано с наличием легкодоступного органического вещества, что позволяет предположить преимущественно копитрофный характер данной группы. Экологические особенности бактерий фила *Verrucomicrobia* на сегодняшний момент еще недостаточно изучены, при этом доминирование данной группы в подповерхностных горизонтах почв позволяет сделать вывод об ослабленной конкуренции веррукомикробий в микробном сообществе и, следовательно, большей склонности данных бактерий к олиготрофному типу питания. Таким образом, впервые создана метагеномная библиотека данных для почв различных типов хронорядов и инвариантных экогенетических смен, возникающих при экзогенных нарушениях почвенного покрова в основных природных зонах Русской равнины. Выявлены основные микробиологические драйверы почвенных процессов в экогенетических сменах регенерационных экосистем.

Работа выполнена при поддержке РФФ: грант 17-16-01-01030

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВ

Т.Н. Ажогина, А.А. Аль-Раммахи, Н.В. Гненная, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: tazhogina@sfnedu.ru; ameer.iraq1982@gmail.com; gnennaya@sfnedu.ru; issa@sfnedu.ru; samara@sfnedu.ru*

Классическим методом оценки токсичности почв является химический анализ. Более перспективным направлением является биотестирование с использованием батареи цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров [1]. Lux-биосенсор – это бактериальная клетка, содержащая гибридную плазмиду, в состав которой встроены два основных элемента: регуляторный участок (промотор и оператор) и ген (гены)-репортер(ы) [2].

Целью данного исследования являлась оценка токсичности почв Ростовской области.

Для исследования были отобраны методом конверта 59 проб почв в Ростове-на-Дону и Ростовской области. Пробы были поделены на 6 групп: 15 проб были отобраны в рекреационных зонах, 23 – в промышленных зонах, 12 – на сельскохозяйственных территориях, 4 – на полигонах твердых бытовых отходов, 3 – на территориях больниц, 2 – пробы донных отложений.

Для оценки генотоксичности почв была использована батарея lux-биосенсоров: *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux), *E. coli* MG1655 (pFabA-lux), *E. coli* MG1655 (pGrpE-lux).

Мерой токсичности служил фактор индукции (I), рассчитываемый как отношение биолюминесценции опытной пробы к биолюминесценции контрольной пробы. При достоверном отличии опыта от контроля $I < 2$, обнаруженный токсический эффект оценивали как «слабый». При $2 \leq I \leq 10$ – как «средний». При $I > 10$ – как «сильный».

При исследовании проб почв на генотоксичность с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) обнаружено, что 31 % проб были загрязнены прямыми мутагенами, при этом максимальный фактор индукции был зарегистрирован в почве, отобранной на поле ЮФУ ($2,59 \pm 0,20$). При использовании метаболической активации наличие промутагенов было установлено для 34 % проб, наибольший токсический эффект обнаружен в почве, отобранной с поля близ г. Цимлянска ($2,47 \pm 0,20$).

При детекции ответа на окислительный стресс, вызываемый наличием в среде супероксид-аниона с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), было установлено наличие поллютантов в 53 % проб, максимальный фактор индукции зарегистрирован в почве, отобранной с пляжа Цимлянского водохранилища. Биосенсор *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), реагирующий на окислительный стресс, вызываемый появлением в среде перекиси водорода, позволил обнаружить в 51 % проб пероксиды.

Для обоих сенсоров максимальные факторы индукции были установлены в пробах почвы, отобранной с пляжа г. Цимлянск, они составили $3,73 \pm 0,21$ и $5,45 \pm 0,41$, соответственно.

При тестировании проб на присутствие веществ, вызывающих повреждение клеточных белков штаммами *E. coli* MG1655 (pIbrA-lux) и *E. coli* MG1655 (pGrpE-lux), было зарегистрировано 39 и 51 % загрязненных проб, соответственно. Максимальные значения фактора индукции составили $4,37 \pm 0,55$ (почва, отобранная с Набережной Ростов-Арены после Чемпионата мира по футболу 2018 г.) и $3,00 \pm 0,34$ (почва, отобранная в районе Областной больницы), соответственно.

При исследовании проб почв на содержание веществ, повреждающих мембраны, с помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pFabA-lux), было зарегистрировано их наличие в 20 % проб, при этом максимальный фактор индукции составил $2,09 \pm 0,21$ в почвах, отобранных на территории завода «Прибор», г. Ростов-на-Дону.

Таким образом, при изучении 59 проб почвы, было установлено наличие веществ, вызывающих генотоксический эффект и окислительный стресс, а также веществ, повреждающих белки и мембраны. Проведенный анализ показал, что наиболее загрязненной является почва рекреационных зон, а именно, пляжа г. Цимлянска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сазыкина М.А., Карчава Ш.К., Журавлева М.В. и др. // Трансформация экосистем под воздействием природных и антропогенных факторов: Мат-лы Междунар. науч. конф. (г. Киров, 16–18 апреля 2019 г.). Киров: ВятГУ, 2019. С. 267.
2. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. // Биотехнология. 2009. №. 6. С. 16–25.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 6.2379.2017/ПЧ), РФФИ (проект № 17-04-00787).

КАСКАДНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ QUORUM SENSING СИСТЕМЫ I ТИПА ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *Aliivibrio logei*

С.В. Баженов^{1,2}, О.Е. Мелькина², С.А. Хрульнова², А.В. Кириченко¹,
И.В. Манухов^{1,2}, Г.Б. Завильгельский²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет), 141701, Российская Федерация, г Долгопрудный, Институтский пер., 9

²НИЦ "Курчатовский институт" – Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов «ГосНИИгенетика», 117545, Российская Федерация, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

E-mail: manukhovi@mail.ru

Люминесценция бактерий *Aliivibrio logei* регулируется по механизму “quorum sensing” (QS) I типа. В составе lux-регулона *A. logei* имеются две копии регуляторного гена – *luxR1* и *luxR2*, – и две регуляторных области – *P11-Pr1* и *P12-Pr2* [1]. Гены *luxCDABE* и *luxI* транскрибируются с двух «правых» промоторов *Pr1* и *Pr2*, соответственно, а гены *luxR1* и *luxR2* – с «левых» *P11* и *P12*.

В настоящей работе было проведено исследование регуляции экспрессии генов с *P11* и *P12* промоторов в зависимости от количества АИ и дозы генов *luxR1* и *luxR2*. Исследование экспрессии проводилось с использованием lux-биосенсоров – клеток *Escherichia coli*, несущих гены *luxCDABE* из *Photobacterium luminescens*? транскрипционно слитые с промоторами *P11* или *P12*.

Показано, что транскрипция с промотора *P11* существенно снижается в зависимости концентрации АИ в клетках, содержащих гены *luxR1* и *luxR2*. При этом увеличение дозы гена *luxR1* не приводит к ауторепрессии, т.е. наличие гена *luxR2* в клетках является необходимым для наблюдения данного

эффекта. Таким образом, имеет место репрессия промотора P_{II} *A. logei*, как и для P_I *A. fischeri*, однако требуется наличие в системе обоих генов *luxR1* и *luxR2*. Отметим, что ранее для P_I промотора *luxR* гена *A. fischeri* было показано, что он также регулируется по принципу отрицательной обратной связи, т.е. при повышенной дозе гена *luxR* и высоких концентрациях АИ наблюдается снижение уровня транскрипции [2].

Транскрипция с промотора P_{I2} напротив резко возрастает при добавлении АИ в среду. Этот эффект наблюдается как в присутствии обоих регуляторных генов, так и каждого по отдельности. В результате положительной обратной связи экспрессия *luxR2* возрастает при добавлении АИ не более чем на порядок. Добавление в систему гена *luxR1* приводит к увеличению наблюдаемого максимального коэффициента индукции P_{I2} промотора до трёх порядков. Таким образом, имеет место каскадное усиление, в котором LuxR1 усиливает экспрессию LuxR2. Последний, в свою очередь, индуцирует промоторы генов *luxCDABE* и *luxI* (рис.). Такое усиление может быть востребовано в стрессовых условиях, так как LuxR1, в отличие от LuxR2, не зависит от шаперона GroEL/ES и протеазы Lon [3].

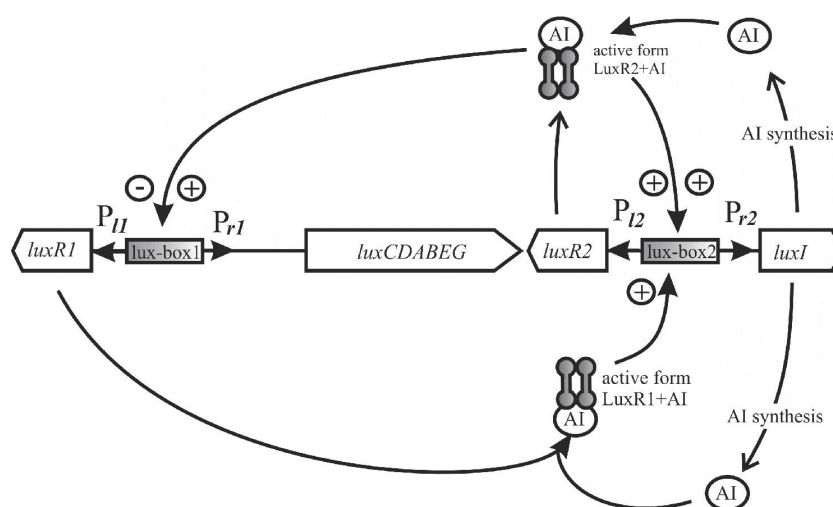


Рис. Схема строения и регуляции *lux*-оперона *A. logei*

Эксперименты с биосенсорами, в которых степень экспрессии гена *luxR1* регулировалась промотором лактозного оперона P_{lac} , а люминесценция регулировалась промотором $Pr2$, показали, что увеличение экспрессии *luxR1* путем добавления IPTG приводит к значительному увеличению чувствительности и амплитуды отклика биосенсорной клетки на добавление АИ-1. Таким образом, усиление экспрессии регуляторного гена необходимо для повышения чувствительности всей системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Manukhov I.V., Khrul'nova S.A., Baranova A., Zavitgelsky G.B. // J. Bacteriol. 2011. Vol. 193, P. 3998–4001.
2. Shadel G.S. and Baldwin T.O. // J. Bacteriol. 1991. Vol.173. P. 568–573.
3. Konopleva M.N., Khrulnova S.A., Baranova A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016. Vol. 473 (4). P. 1158–1162.

ОСОБЕННОСТИ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА БОЛЬНЫХ АНТРАКОСИЛИКОЗОМ

Е.Д. Баранова, В.П. Волобаев, В.Г. Дружинин

Кемеровский государственный университет, 65000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6
E-mail: laveivana@mail.ru; volobaev.vp@gmail.com; druzhinin_vladim@mail.ru

Бактериальная микрофлора, населяющая наш организм, составляет сложнейшее сообщество микроорганизмов, называемое микробиотой. Эволюционно закрепившийся бактериальный состав участвует как в поддержании нормального физиологического гомеостаза, так и в развитии различных патологических состояний, преимущественно за счёт способности модулировать мутационный процесс в клетках организма хозяина. Взаимосвязь статуса микробиома человека с мутагенными и канцерогенными эффектами возможно способна наиболее ярко проявиться в условиях выраженной (профессиональной) экспозиции экологическими токсикантами.

Целью данной работы является проверка гипотезы о том, что стабильность генома человека в условиях профессиональной экспозиции генотоксическими факторами угольной индустрии может прямо (или опосредованно) зависеть от состава бактериальной микробиоты верхних дыхательных путей, который, в свою очередь, может быть связан с развитием профессиональной патологии органов дыхания. В структуре профессиональной заболеваемости шахтёров форма лёгочной патологии антракосиликоз (АС), по диагнозам, занимает первое место.

В ряду промышленных предприятий, относящихся к разряду опасных по параметрам загрязнения окружающей среды мутагенами и канцерогенами, особая роль отводится производствам угольного цикла (добыча и переработка). В производственных циклах и отходах этих предприятий выделяется целый комплекс генотоксических факторов, которые приводят к увеличению общей и онкологической заболеваемости в контингентах работников угольной индустрии. Загрязнения окружающей среды, несомненно, влияют на здоровье человека, которое во многом определяется стабильностью его генома. Свой вклад в определение стабильности генома, поддержание генетического гомеостаза в условиях экспозиции комплексом негативных факторов угледобывающего производства (согласно предложенной гипотезе) должны вносить количественные и качественные особенности микробиома респираторного тракта. Для оценки видового состава микробиоты респираторного тракта шахтёров, больных АС, и шахтёров, не имеющих лёгочной патологии, использовалось секвенирование образцов по переменным регионам V3-V4 гена *16s* рНК на секвенаторе Illumina MiSeq в соответствии с протоколом производителя. Отмечена ассоциация данного заболевания с бактерией *Streptococcus agalactiae*. В группе шахтёров, в которой количество *S. agalactiae* превышало 15 % от общего видового состава, заболевание отмечено у 76,5 % обследованных. В то время как в группе шахтёров, в которой количество *S. agalactiae* было менее 15 % от общего видового состава, заболевание отмечено у 14,7 % рабочих (OR=18,84; $\chi^2=26,14$; $p<0,00001$).

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ №18-44-420017.

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ И СПЕКТР МУТАЦИЙ *M. tuberculosis*, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ФТОРХИНОЛОМ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

С.А. Бережной^{1,2}, О.Д. Антонова¹, Н.И. Будина¹

¹*Областной клинический центр фтизиопульмонологии», 344065, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Орская 24*

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: serberezhnaya@sfedu.ru

Фторхинолоны – антибактериальные препараты, действующие на активно размножающуюся популяцию микобактерий туберкулеза. В различных регионах частота встречаемости мутаций в генах, определяющих лекарственную чувствительность к данным антибактериальным препаратам, не однородна.

Целью исследования являлось изучение распространенности и спектра мутаций в гене *gyrA*, определяющих чувствительность к фторхинолонам в штаммах *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Ростовской области.

Исследованы 409 образца ДНК *M. tuberculosis* с установленной множественной лекарственной устойчивостью от больных туберкулезом, мужчин и женщин в возрасте от 18 до 70 лет, жителей Ростовской области. Пациенты находились в интенсивной фазе лечения в ГБУ РО «ОКЦФП» в 2018г. Для выделения ДНК возбудителей туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности к фторхинолонам, а также изучения спектра генетических мутаций ДНК *M. tuberculosis* в диагностических образцах применяли наборы «Амплитуб-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ» (ООО «Синтол», Россия). PCR Real Time проводили с применением детектирующего амплификатора ДТ-прайм (ООО «ДНК-технология», Россия).

В результате нашего исследования наличие мутаций не выявлено, лекарственная чувствительность сохранена для 187 (45,7 %) штаммов, выявлена устойчивость к фторхинолонам 222 (54,3 %). Частота встречаемости мутаций в гене *gyrA* определяющих лекарственную устойчивость к фторхинолонам: 90-й кодон – 45 (20,3 %); 94-й кодон – 164 (73,9 %); сочетанные мутации в двух кодонах *gyrA90* и *gyrA94* – 10 (4,5 %); *gyrA90* и *gyrA91* – 3 (1,3 %).

Таким образом, в Ростовской области среди штаммов с определенной множественной лекарственной устойчивостью установлен высокий уровень пре-ШЛУ (широкой лекарственной устойчивости) *M. tuberculosis* – 54,3 %, выявляемый молекулярно-генетическими методами. Определено, что среди штаммов, устойчивых к фторхинолонам, зарегистрирован высокий уровень мутации в 94-м кодоне гена *gyrA* 73,9 % случаев.

ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВОДОЁМОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ ГЕНАМИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

***Н.В. Гненная, Л.Е. Хмелевцова, А.А. Аль-Раммахи, Т.Н. Ажогина, И.С. Сазыкин,
М.А. Сазыкина***

Южный федеральный университет, 344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1

E-mail: ngnennaya@inbox.ru, warsecret777@rambler.ru, ameer.iraq1982@gmail.com, t.azhogina@mail.ru, issa@sfedu.ru, samara@sfedu.ru

Бесконтрольное применение антибиотиков привело к их массовому воздействию на окружающую среду и распространению лекарственной устойчивости. В настоящее время отмечается нарастание устойчивости к антибиотикам не только у возбудителей заболеваний, но и у микроорганизмов природных биоценозов водных и почвенных экосистем.

Исследований, посвященных проблеме процесса накопления и передачи генов устойчивости к антибиотикам в природных бактериоценозах, на сегодняшний день немного, поэтому поиск генов лекарственной устойчивости в водоемах Ростовской области представляет особый интерес [1]. Целью данной работы было выявление генов устойчивости к антибиотикам в образцах воды и донных отложений водоемов Ростовской области.

Для идентификации генов устойчивости к антибиотикам был произведен отбор проб воды и донных отложений с сентября 2016 по ноябрь 2017 года. Выделение тотальной ДНК из отобранных образцов воды и донных отложений производилось посредством метода, модифицированного в лаборатории экологии и молекулярной биологии АБиБ ЮФУ [2]. ПЦР-амплификация осуществлялась с использованием наборов для идентификации генов антибиотикорезистентности к карбапенемам (гены *VIM*, *OXA-48*, *NDM*), цефалоспорином (гены *MecA*, *CTX-M*), гликопептидам (гены *VanA* и *VanB*), тетрациклину и эритромицину (НПФ «Литех», Россия).

В результате проведенного исследования были обнаружены гены устойчивости к тетрациклину в образцах воды, отобранной на Северном водохранилище. Гены *VIM* и *OXA-48* обнаружены в образцах

воды, отобранной в реке Дон. Стоит отметить, что из всего широкого спектра бета-лактамаз именно карбапенемазы представляют особую опасность ввиду их высокой каталитической активности, а также широкого спектра субстратной специфичности [3].

Полученные в ходе исследования результаты указывают на то, что высокая антропогенная нагрузка, оказываемая на водные экосистемы Ростовской области, может способствовать накоплению и распространению генов устойчивости к антибиотикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гненная Н.В., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т.14, № 1. С. 77–85.
2. Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. и др. // Валеология. 2015. № 3. С. 42–46.
3. Уляшова М.М., Халилова Ю.И., Рубцова М.Ю. и др. // АСТА NATURE. 2010. № 3 (6). С. 116–125.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.2379.2017/ПЧ); при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-00787 А).

РОЛЬ АТФ-ЗАВИСИМЫХ ШАПЕРОНОВ В РЕФОЛДИНГЕ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ В БАКТЕРИЯХ *Escherichia coli* И *Bacillus subtilis*

Е.Ю. Гнучих¹, И.В. Манухов², Г.Б. Завильгельский¹

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 117545, Российская Федерация, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

²Московский физико-технический институт (государственный университет), 141701, Российская Федерация, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

E-mail: gnuchih_evgeniy@mail.ru, manukhovi@mail.ru, zavilgel@genetika.ru

Термостабильность белков-ферментов определяют *in vitro*, измеряя ферментативную активность при инкубировании при постоянной температуре. Рефолдинг термоинактивированных белков-ферментов проводят как *in vitro*, так и *in vivo*, в присутствии шаперонов, как правило, при температуре, оптимальной для проявления ферментативной активности. Для поддержания в клетке нативных структур макромолекул (ферменты, РНК) с помощью АТФ-зависимых шаперонов при стрессе (например, при повышенной температуре) затрачивается значительное количество энергии (АТФ → АМФ), что позволяет бактерии выжить при неблагоприятных условиях. Термостабильность белков-ферментов можно определять не только *in vitro* с использованием очищенных препаратов, но и *in vivo*, непосредственно в бактериальной клетке. При этом термоинактивация и рефолдинг фермента осуществляются одновременно, – процесс, характерный для термодинамически неравновесных систем. Однако в этом случае необходимо использовать метод, с помощью которого можно разделить процессы истинной термоинактивации фермента и одновременно осуществляемого рефолдинга, проводимого клеточными АТФ-зависимыми шаперонами. Для этой цели в настоящей работе мы использовали: 1) разобщитель окислительного фосфорилирования – протонофор карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон (СССР), позволяющий снижать внутриклеточную концентрацию АТФ до минимального уровня и 2) низкомолекулярное гидрофобное вещество (-)-лимонен (C₁₀H₁₆). Так как для процесса рефолдинга белкам-шаперонам требуется гидролиз значительного количества АТФ, то можно было ожидать, что при добавлении СССР к суспензии бактерий будет происходить снижение шаперон-зависимого рефолдинга. Использование гидрофобного (-)-лимонена в качестве ингибитора шаперон-зависимого рефолдинга основано на ранее опубликованных данных об эффективном ингибировании

DnaKJE-зависимого рефолдинга *in vivo* при добавлении к суспензии бактерии гидрофобных низкомолекулярных кетонов [1].

В качестве белков-субстратов использовали бактериальные люциферазы *Photobacterium leiognathi* и *Photobacterium luminescens*, которые характеризуются пониженной термостабильностью, что позволяет проводить измерение термоинактивации и шаперон-зависимого рефолдинга ферментов непосредственно в бактериальной клетке. В настоящей работе показано, что в грамотрицательных бактериях *Escherichia coli* рефолдинг термоинактивированных люцифераз осуществляется в основном АТФ-зависимым шапероном DnaK-DnaJ-GrpE (DnaKJE), однако в грамположительных бактериях *Bacillus subtilis* шаперон DnaKJE в рефолдинге термоинактивированных белков практически не участвует. При наличии в суспензии клеток СССР или (-)-лимонена (*Escherichia coli* MG1655 - СССР, 50 мМ; (-)-лимонен, 9,3 мМ и *B. subtilis* 168 - СССР, 5 мМ; (-)-лимонен, 9,3 мМ) рефолдинг белков практически полностью отсутствует. Термостабильность люциферазы *P. luminescens* (при 43,5°C) *in vivo* в *E. coli* MG1655 *dnaK*⁺ примерно в 12 раз выше термостабильности препарата люциферазы *in vitro*. Термостабильность люциферазы *P. luminescens in vivo* в *B. subtilis* 168 примерно в 24 раза выше термостабильности препарата люциферазы *in vitro*. Следовательно, термостабильность фермента в грамположительных бактериях примерно в два раза выше таковой в грамотрицательных бактериях. При добавлении СССР или (-)-лимонена к суспензии клеток *E. coli* и *B. subtilis* на ранней стадии термоинактивации скорости термоинактивации люциферазы, измеренные *in vivo* и *in vitro*, практически совпадают. Для объяснения полученных в настоящей работе результатов необходимо предположить наличие в бактериальной клетке двух групп АТФ-зависимых шаперонов. Первая группа шаперонов (например, DnaKJE-шаперон в *E. coli*) способна осуществлять рефолдинг белков, как при низкой температуре (сниженной после термоинактивации белка), так и при высокой температуре, при которой происходит термоинактивация белка. Вторая группа шаперонов (например, шапероны ClpA, ClpB, HtpG в *E. coli*, ClpC, ClpE, HtpG в *B. subtilis*) не способна проводить стандартный рефолдинг (т.е. при пониженной температуре), но способна поддерживать неравновесную стабилизацию нативной формы белков при высокой температуре, причем в грамположительных бактериях (*B. subtilis*) данная группа шаперонов значительно более эффективна по сравнению с таковой группой шаперонов в грамотрицательных бактериях (*E. coli*). Однако в грамотрицательных бактериях (*E. coli*) более эффективен АТФ-зависимый шаперон первой группы DnaKJE.

ЛИТЕРАТУРА

1. Melkina O.E. et al. // Appl. Microbiol. Biothenol. 2017. Vol. 101. P. 5765–5771.

ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ВНЕСЕНИЯ УГЛЕРОДИСТЫХ СОРБЕНТОВ И ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СОСТОЯНИЕ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ *Hordeum vulgare* L.

А.В. Горовцов^{1,2}, Т.М. Минкина¹, В.В. Зинченко¹, В.А. Чаплыгин¹

¹ Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

² Федеральный Ростовский аграрный научный центр, 346735, Российская Федерация, Ростовская обл., Аксайский р-н пос. Рассвет, Институтская, 1

E-mail: gorovtsov@gmail.com; tminkina@mail.ru; zinj007@gmail.com

Загрязнение почв тяжёлыми металлами (ТМ) связано интенсивным антропогенным воздействием на экосистемы в процессе хозяйственной деятельности человека. Избыточная концентрация ТМ в воздухе, почве и воде может оказывать выраженное токсическое влияние на рост и развитие растений.

Дальнейшая их миграция по трофическим цепям и биоаккумуляция, затрагивают всю экосистему и представляют угрозу для человека.

Чрезвычайно высокие концентрации Zn (до 98 000 мг / кг) и Cu (до 303 мг / кг) отмечены в отложениях Атаманского озера (расположенного в Каменском районе Ростовской области) и в прилегающих почвах [1, 2]. Сброс загрязняющих веществ в озеро происходил в период с 1957 по 1987 годы в процессе работы промышленного предприятия, расположенного рядом с озером. В настоящее время озеро сухое, и на его поверхности идут активные почвообразовательные процессы.

Ремедиация почв с настолько высоким уровнем загрязнения представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Полное удаление металлов из почвы не представляется возможным, и основной задачей ремедиации становится иммобилизация ТМ в почве для снижения их токсичности по отношению к растениям и формирования устойчивого растительного покрова, препятствующего ветровой эрозии и загрязнению прилегающих территорий. В решении этой задачи ведущая роль принадлежит использованию сорбентов.

Биочар является углеродистым сорбентом, имеет большую площадь поверхности и повышает активность микробного сообщества и рост растений за счёт улучшения состояния почвы. Применение биочара может снизить подвижность ТМ и их биодоступность. Использование биочара в сочетании с микроорганизмами в загрязнённых почвах может увеличить эффективность данного сорбента из-за активной колонизации бактериями его пористой поверхности. При этом взаимодействие биочара и микроорганизмов, а также их влияние на растения, выращенные на загрязнённых почвах, остаётся недостаточно неизученным. В рамках данной работы был проведен модельный эксперимент оценивающий рост *H. vulgare* L., накопление и распределение Zn, Mn, Cr, Cu, Pb, Ni и Cd в различных растительных тканях при внесении в загрязнённую почву биочара, микроорганизмов и их сочетания.

Опыт закладывался по следующей схеме: 1) контроль (чистая почва); 2) загрязнённая почва оз. Атаманское; 3) загрязнённая почва + 2,5 % биочара; 4) загрязнённая почва + 10¹⁰ КОЕ/кг бактерий – смесь металлоустойчивых штаммов *Bacillus pumilus*, *B. atrophaeus* и *B. cereus*; 5) загрязнённая почва + биочар+бактерии. Выращивание растений проводилось в вегетационных сосудах объёмом 2 л в течение 60 дней.

В результате внесения биочара, бактерий, и в особенности их сочетания, наблюдалось ярко выраженное снижение негативного воздействия на рост и развитие растений (рис.)

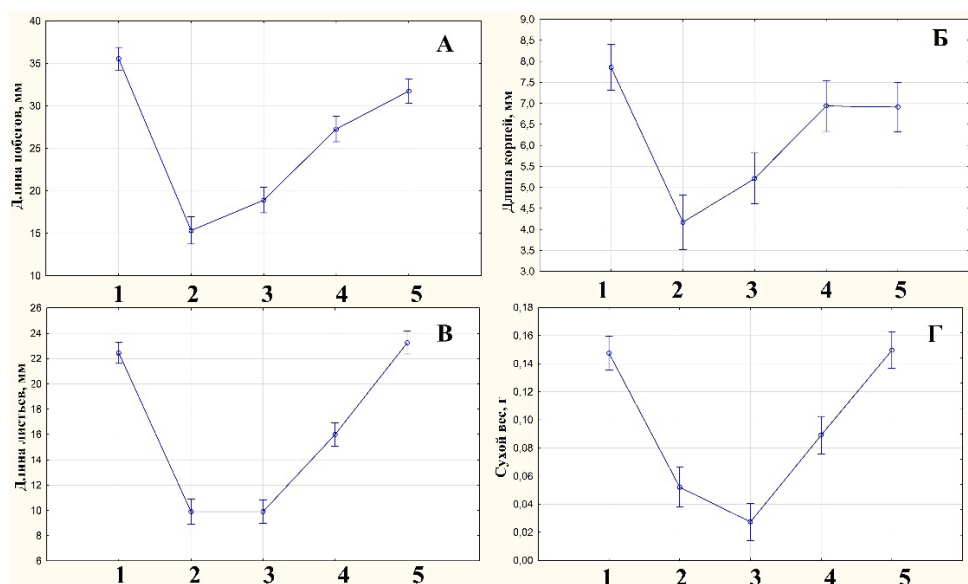


Рис. Влияние загрязнения и вариантов экспериментальной ремедиации на морфобиометрические показатели растений ячменя: длину побегов (А), длину корней (Б), длину листьев (В) и сухой вес растений (Г).

Сходным образом снижалось и содержание ТМ в растениях – при совместном внесении бактерий и биочара снижение в побегах составило 5,7 раз для Mn, 4,5 раза для Zn, 9,9 для Cr, 3,1 для Cu, 14,6 Pb, 17 для Ni и 11,9 для Cd по сравнению с загрязнённой почвой. В корнях снижение составило 2,08 2,51 2,09 1,94 3,55 3,18 2,24 раз, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gorovtsov A., Minkina T.M., Morin T. et al. // Journal of Soils and Sediments. 2019. Vol. 19 (8). P. 3127–3138.
2. Приваленко В.В., Мазуренко В.Т., Панасков В.И., & Мухин, Н.В. Экологические проблемы города Каменска-Шахтинского. Ростов н/Д, Изд-во: ЗАО «Цветная печать», 2000.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ № 5.948.2017/ПЧ и гранта Президента РФ МК-2818.2019.5.

ВЫДЕЛЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ПОЧВ ОЗ. АТАМАНСКОЕ

А.В. Горовцов, Т.М. Минкина, С.Н. Сушкова, В.А. Чохели

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: gorovtsov@gmail.com; tminkina@mail.ru; terra_rossa@mail.ru

В результате промышленного производства и хозяйственной деятельности человека значительные территории оказываются загрязнены тяжёлыми металлами. При этом наибольшие их концентрации накапливаются в почвах, которые являются стационарным компонентом экосистемы и активно сорбируют поступающие поллютанты. Для противодействия негативным процессам, связанным с загрязнением почв, во всём мире активно разрабатываются методы ремедиации почв. Одним из наиболее перспективных и экологически безопасных подходов является использование микроорганизмов, способных к иммобилизации тяжёлых металлов в почве. Источником выделения перспективных штаммов могут служить разные природные среды, однако наиболее рациональным является поиск устойчивых микроорганизмов в загрязнённых почвах, территориально близких к месту предполагаемой биоремедиации. Такие штаммы, с одной стороны, приспособлены к выживанию в присутствии высоких концентраций металлов, а с другой – адаптированы к локальным почвенно-климатическим условиям того или иного региона.

В данной работе представлены результаты выделения и молекулярно-генетической идентификации штаммов спорообразующих бактерий, перспективных для применения в условиях юга России.

Источником выделения штаммов послужили почвы высохшего оз. Атаманское (Каменский район Ростовской области), в период с 1957 по 1987 годы использовавшегося в качестве шламонакопителя отходов промышленного предприятия. Концентрация цинка в отдельных точках данной территории достигает 98 000 мкг/кг, также многократно превышено ПДК меди, кадмия, мышьяка и ряда других элементов. Выделение штаммов спорообразующих бактерий производилось путём посева пастеризованной почвенной суспензии на среду сусло-агар-МПА с добавлением сульфата цинка в концентрации 45 мг/кг⁻¹. Выросшие колонии подвергались направленному отбору с использованием градиентного агара, содержащего возрастающие концентрации цинка, что позволило выделить 10 наиболее устойчивых штаммов. Данные штаммы были подвергнуты молекулярно-генетической идентификации путём выделения ДНК и секвенирования гена *16SrRNA*. Для получения ампликонов использовались праймеры 27F и 1492R. Секвенирование генов проводилось на базе Междисциплинарного ЦКП Казанского федерального университета на приборе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, USA). Результаты видовой идентификации штаммов и их устойчивость к цинку приведены в таблице.

Результаты идентификации штаммов металлоустойчивых микроорганизмов

Штамм	МПК Zn в среде	Номер записи в Genbank	Виды с наиболее близкой последовательностью гена 16SrRNA
TR 1.5	136,5 мг кг ⁻¹	МК239915	<i>Bacillus subtilis</i>
TR 2	91 мг кг ⁻¹	МК239933	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus aryabhatai</i>
TR 3.1	182 мг кг ⁻¹	МК239935	<i>Bacillus pumilus</i>
TR 3.2	91 мг кг ⁻¹	МК239936	<i>Bacillus pumilus</i>
20.1	182 мг кг ⁻¹	МК240475	<i>Bacillus proteolyticus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus wiedmannii</i>
TR 3.3	182 мг кг ⁻¹	МК240476	<i>Bacillus atrophaeus</i>
20.2	91 мг кг ⁻¹	МК240484	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus toyonensis</i>
TR 4.1	136,5 мг кг ⁻¹	МК241977	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus toyonensis</i>
TR 4.2	91 мг кг ⁻¹	МК240486	<i>Bacillus stratosphericus</i>
TR 1.1	91 мг кг ⁻¹	МК240487	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus toyonensis</i>

Все выделенные штаммы принадлежали к роду *Bacillus*. Для данного рода характерно наличие большого числа близких видов, которые невозможно различить только на основании секвенирования гена *16SrRNA*. Точная идентификация до вида требует использования комплексного подхода [1], а именно, секвенирования нескольких генов, либо одновременного применения методов на основе иных принципов, например, масс-спектрометрии MALDI-TOF или биохимического профилирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коршунов С.О., Горюцов А.В., Фалеева Т.Г. и др. // Микробиология. 2014. Т. 83. №. 4. С. 451–451.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-29-05265мк и гранта Президента РФ № МК-2973.2019.4.

РОЛЬ ДНК-ГЕЛИКАЗЫ, КОДИРУЕМОЙ ГЕНОМ *UvrD Deinococcus Radiodurans* R1, В ФЕНОМЕ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Е.П. Гулевич, Л.В. Кузнецова, Ю.В. Киль, В.Н. Вербенко

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Российская Федерация, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр Орлова роща, 1

E-mail: verbenko_vn@npi.nrcki.ru

Бактерия *D. radiodurans* хорошо известна из-за высокой устойчивости к экстремальным воздействиям высушивания и радиации, вызывающих различные типы повреждений ДНК, включая двунитевые разрывы (ДР). Так как и одиночный нерепарированный ДР ДНК обычно летален, ДР рассматриваются как наиболее тяжёлые формы повреждения генома. Экстремальная

радиорезистентность дейнококка связана с его способностью реконструировать геном из сотен хромосомных фрагментов. Реконструкция генома идёт через двухстадийный процесс: первая стадия – зависящий от протяженного синтеза отжиг нити (ESDSA), который собирает фрагменты генома в длинные линейные интермедиаты; вторая стадия – рекомбинация, генерирующая кольцевые хромосомы. *D. radiodurans* располагает гомологами ключевых компонентов RecF-пути рекомбинации – основного пути рекомбинационной репарации в этом организме, как это имеет место и в других бактериях, не имеющих гомологов RecBCD-пути рекомбинации. Вместе с тем роль ДНК-геликазы UvrD в рекомбинационной репарации ДНК у бактерий может быть недооценена из-за наличия в модельном объекте *Escherichia coli* активного RecBCD-зависимого пути рекомбинационной репарации. Сложившаяся парадигма предполагает основную роль RecBCD-пути рекомбинации в репарации ДР и минорную – RecF-пути.

В *E. coli* RecF-путь включает 5'-3'-однонитевую ДНК-эксонуклеазу RecJ, геликазу RecQ и белки RecF, RecO и RecR, которые действуют вместе, чтобы обеспечить загрузку белка RecA на однонитевую ДНК. Геликазы UvrD и HelD рассматриваются как возможные, но необязательные участники этого пути рекомбинации, хотя признаётся роль геликазы UvrD в восстановлении репликативных вилок при повреждении геликазы Rep. Предполагается, что в *D. radiodurans* репаративная геликаза UvrD, замещая RecQ, действует в паре с RecJ и генерирует однонитевые хвосты, на которых комплекс RecFOR будет стимулировать загрузку RecA [1]. Остаётся интригующим вопрос, за счёт чего в итоге достигается высокая радиостойчивость *D. radiodurans*. Перспективным направлением исследования механизмов радиорезистентности выглядит перенос гена *uvrD* из *D. radiodurans* на генетический фон *E. coli* для сопоставления свойств этой репаративной геликазы у разных по радиостойчивости видов.

Целью этой работы стало клонирование репаративной геликазы *uvrD* бактерии *D. radiodurans* в клетках *E. coli* и изучение её способности комплементировать мутации в различных геликазах и восстанавливать радиостойчивость данного микроорганизма.

Фрагмент геномной ДНК радиостойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* с геном *uvrD*, кодирующим ДНК-геликазу II, был клонирован в клетках модельного объекта – *Escherichia coli* K-12. Плазмида pCR 2.1-*uvrD*⁺ восстанавливает радиорезистентность к ультрафиолетовому свету мутантных клеток *E. coli* *uvrD*⁻, *hld*⁻ и *rep*⁻, дефектных по репаративной геликазе II, геликазе IV и репликативной геликазе Rep, соответственно, практически до уровня дикого типа AB1157 (*uvrD*⁺) и, в меньшей степени, штамма с мутацией в гене *recQ*, кодирующем ключевую геликазу рекомбинационной репарации RecQ. Защитный эффект также заметен при облучении штаммов с плазмидой γ -лучами. Выравнивание первичной последовательности геликазы II *D. radiodurans* с 4 геликазами *E. coli* с использованием программы BLASTP НЦБИ (США) показало, что идентичность составляет 35 % для пары *drUvrD/ecUvrD*, 38 % – для *drUvrD/ecRep* и 27 % – для *drUvrD/ecHelD*. Однако характерные мотивы геликазы II, представленные семью элементами, оказались весьма консервативными и практически совпадают у геликаз *drUvrD*, *ecUvrD*, *ecRep* и *ecHelD*. Особый случай представляет геликаза *ecRecQ*, относящаяся к другому семейству, у которой из всей последовательности только один небольшой участок на С-конце, присущий всем геликазам, совпадает с *drUvrD*. Несмотря на это субстратная специфичность UvrD *D. radiodurans* в значительной степени совпадает с предпочтениями RecQ *E. coli*. Таким образом, установлены широкие функциональные возможности геликазы UvrD *D. radiodurans*. Способность *drUvrD* расплетать 5'- и 3'-дуплексную ДНК [2] может отражать ее участие в различных репарационных путях. Обсуждаются структурные особенности семейства ДНК-геликаз из крайне радиорезистентных бактерий, которые могут объяснить их высокую устойчивость к повреждениям ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bentchikou E., Servant P., ve Coste G., Sommer S. // PLoS Genetics. 2010. № 6 (1). P. 1–12. e1000774.
2. Stelter M., Acajjaoui S., McSweeney S., Timmins J. // PLoS One. 2013. № 8 (10). P. 1–17. e77364.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕТЕРГЕНТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЁНОК

В.Ю. Дробот, В.А. Выростков, Е.В. Яровая, А.В. Гильдебрант

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета,
344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: drobot@sfedu.ru; vyrostkov@sfedu.ru; ekyarovaya@sfedu.ru; gildebrant@sfedu.ru

Биоплёнки – это особая форма микробных сообществ, которые фиксируются на различных биотических и абиотических поверхностях. Их организация (микробные клетки и ассоциированный с ними внеклеточный матрикс, состоящий из полисахаридов, ДНК и белков) позволяет обеспечить физиологическую и функциональную стабильность [1].

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) – химические соединения, которые, концентрируясь на поверхности раздела термодинамических фаз, вызывают снижение поверхностного натяжения. Эти вещества широко используются в повседневной жизни человека, однако столь частое использование приводит к увеличению нарастания массы биоплёнок на поверхностях сточных труб и вод, на медицинском оборудовании и т.д. Это вызывает серьезные затруднения в борьбе с ними [2, 3].

Целью данной работы являлось оценить влияние чистого ПАВ (sodium lauroyl sarcosinate) и синтетического моющего средства (СМС) на его основе Детское крем-мыло Ecolab «0 месяцев +» (ООО «ЭкоЛаборатория», Россия) в различных концентрациях (0,001 %, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 %) на интенсивность образования биоплёнки штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-1035. Для количественного определения интенсивности образования биоплёнок использовался метод окрашивания кристаллическим фиолетовым [4].

В ходе исследования было показано, что sodium lauroyl sarcosinate в концентрациях 0,001 %; 0,005 и 0,1 % оказывает подавляющее действие на интенсивность образования биоплёнки. Максимальный эффект зарегистрирован в концентрации 0,1 % – значение оптической плотности (ОП) ниже контроля на 55,72 %. В концентрации 0,05 % наблюдалось стимулирующее действие на формирование биоплёнки – значение ОП выше контроля на 101,74 %.

Детское крем-мыло «Ecolab» оказывает подавляющее действие на интенсивность образования биоплёнки во всех исследованных концентрациях, причём максимальный ингибирующий эффект показан в концентрации 0,5 % – ОП ниже контрольных значений на 60,24 %.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что sodium lauroyl sarcosinate в чистом виде способен в различных концентрациях оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие на биоплёнокообразование. СМС на его основе (Детское крем-мыло Ecolab «0 месяцев +») подавляет развитие биоплёнки во всех исследованных концентрациях. Такая разница в действии может быть обусловлена присутствием в мыле дополнительных компонентов. Точная концентрация sodium lauroyl sarcosinate в данном СМС неизвестна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Flemming H.C., Wingender J. // Nature reviews microbiology. 2010. Vol. 8, №. 9. P. 623.
2. Olsen I. // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2015. Vol. 34. №. 5. P. 877–886.
3. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. // Микробиология. 2007. Vol. 76. № 2. P. 149–163.
4. Гильдебрант А.В. и др. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19. №. 1.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 6.2379.2017/ПЧ), РФФИ (проект № 17-04-00787).

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОСТИ ПЕСТИЦИДОВ-АНАЛОГОВ В МОДИФИЦИРОВАННОМ ФОРМАТЕ ТЕСТА ЭЙМСА

О.В. Егорова, Н.А. Илюшина

*Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Российская Федерация, Московская область, городское поселение Мытищи, ул. Семашко, 2
E-mail: ovycherova@mail.ru*

В настоящее время современная концепция определения мутагенной активности химических веществ, основанная на стандартных тестах, не обходится без использования метода оценки обратных мутаций на бактериях, также известного как тест Эймса. За последние десятилетия широкое применение, в том числе и в регуляторных целях, нашел миниатюризированный формат теста, основанный на использовании микро- или макропланшетов. Основными преимуществами такого формата является небольшое количество тестируемого вещества, снижение трудо- и временных затрат, а также возможность автоматизации процесса.

В данной работе проведен сравнительный анализ результатов определения генотоксической активности воспроизведённых действующих веществ пестицидов с использованием 6-луночных планшетов и стандартного формата на чашках Петри (90 мм).

В качестве тестируемых соединений использовали образцы технических продуктов мезотриона, карбендазима, диметоата, оксифлуорена, фипронила и хлорпирифоса.

При использовании стандартного формата оценивали технические продукты действующих веществ пестицидов в концентрациях 0,05; 0,16; 0,5; 1,6 и 5,0 мг на чашку. Выявлены слабые мутагенные эффекты диметоата (образец 1, на штаммах TA100 и TA102; образец 2, TA97, TA100 и TA102), карбендазима (образец 2, TA97 и TA98) и мезотриона (TA97, TA102). Неопределённые результаты в стандартном формате получены при тестировании технических продуктов оксифлуорена (TA98), карбендазима (образец 1, TA97), хлорпирифоса (TA100 и TA102), фипронила (TA100), высокие дозы которых индуцировали статистически значимое зависящее от дозы превышение числа ревертантов по сравнению со спонтанным фоном мутирования, но максимальная кратность превышения числа ревертантов не превышала 1,5–1,8.

На 6-луночных планшетах объём вносимых компонентов был уменьшен в пять раз по сравнению со стандартной прописью. Концентрации тестируемых веществ составили 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 мг на лунку. Дополнительно оценивали эффект технических продуктов в дозе 5,0 мг/лунку, что в пересчете на концентрацию, используемую в стандартном формате, составило 25 мг/чашку.

Сравнительный анализ генотоксической активности воспроизведённых действующих веществ пестицидов с использованием 6-луночных планшетов и стандартного формата показал, что для технических продуктов карбендазима (образец 2), диметоата (образцы 1 и 2), фипронила и оксифлуорена получены сопоставимые результаты.

Не обнаружена значимая мутагенная активность при тестировании технического продукта хлорпирифоса с помощью модифицированного формата теста Эймса. Воспроизводимое, статистически значимое зависящее от дозы превышение числа ревертантов по сравнению со спонтанным фоном мутирования наблюдали на штамме TA97 при внесении мезотриона в дозах 1,0 и 5,0 мг/лунку с кратностью 1,5–1,6. Оценивая генотоксическую активность карбендазима, положительный мутагенный эффект выявили при тестировании образца в дозе 5,0 мг/лунку (25 мг/чашку).

Сопоставление эффектов, выявляемых в тесте Эймса в стандартном формате и на 6-луночных планшетах, показало, что в большинстве случаев получены одинаково направленные результаты. Таким образом, уменьшенный формат теста Эймса может быть использован для оценки мутагенности пестицидов-аналогов. Применение такого формата позволит существенно снизить количество используемых материалов и животных (для получения фракции S9), сократить трудозатраты и, следовательно, уменьшить себестоимость экспериментов, обеспечивая при этом высокую производительность теста.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

С.А. Емельянцева, Е.В. Празднова

Академия биологии и биотехнологии Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: emelyancev@sfnedu.ru

Биологические свойства углеродных наночастиц уже долгое время удерживают к себе интерес по причине потенциально высоких, в зависимости от условий приготовления и растворителей, антиоксидантных либо токсических свойств. В частности, для фуллерена C_{60} (раствор 0,8 г/л в оливковом масле) установлены геропротекторные свойства [1], но есть и данные о его токсичности [2, 3]. Однако затем сами авторы отметили, что усиление токсичности C_{60} вызвано использованием тетрагидрофурана для растворения фуллерена [3].

Целью нашего исследования было изучить влияние не модифицированного фуллерена C_{60} на жизнедеятельность *E. coli* как модель митохондрий эукариот, определение протекторного эффекта фуллерена C_{60} при действии стандартных индукторов, анализ результатов экспериментов.

Для исследования биологических свойств фуллерена C_{60} были проведены биолюминесцентные тесты с использованием генномодифицированных штаммов бактерий-биосенсоров. Штаммы *E. coli* MG1655, pKatG-lux и pResA содержат гибридную плазмиду, в которую встроена регуляторная область (промотор и оператор), причем репортерный оперон lux-CDABE выделен из генома светящихся бактерий. При внесении токсических агентов в культуру соответствующего им биосенсора происходит усиление свечения по сравнению с контролем. Было установлено, что раствор C_{60} в оливковом масле в концентрации 0,8 г/л оказывает высокий антиоксидантный эффект против перекиси водорода в концентрации 10^{-3} моль/л (рис. 1) и ДНК-протекторный эффект при введении диоксида в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л в качестве индуктора (рис. 2).

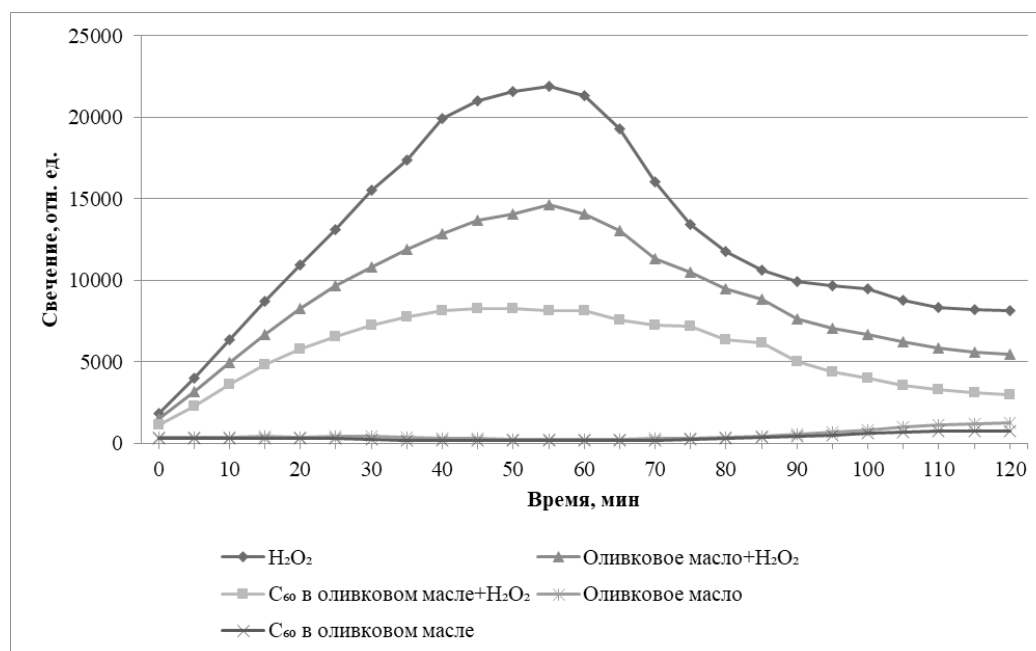


Рис. 1. Биологический эффект фуллерена C_{60} в оливковом масле: антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода

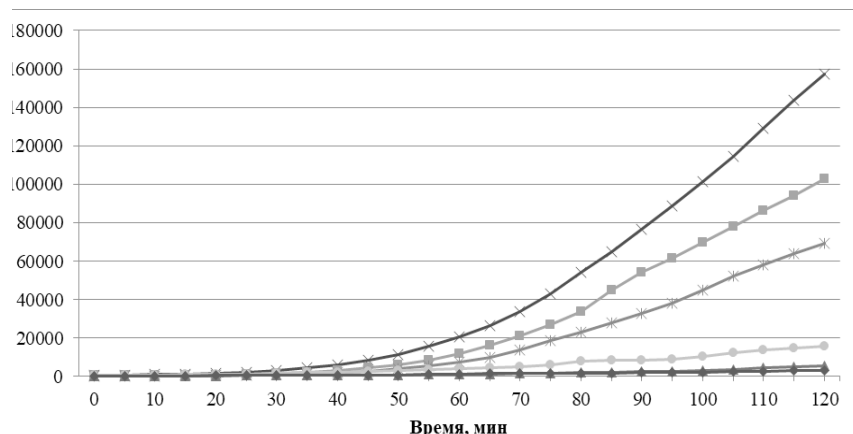


Рис. 2. Биологический эффект фуллерена C_{60} в оливковом масле: снижение генотоксичности диоксида

Данный эффект может объясняться способностью C_{60} проникать внутрь биологических мембран, приобретать положительный заряд, захватывая до шести протонов внутрь молекулы и присоединять гидроксил-радикалы по двойным связям [4]. Таким образом может происходить разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, что приводит к снижению уровня образования АФК (активных форм кислорода), таких как супероксид-анион радикал, вследствие снижения трансмембранного потенциала [4].

Токсического эффекта при использовании C_{60} в данной тест-системе не наблюдалось. Однако в нашей предыдущей работе [5] суспензии фуллерена C_{60} в 2 %-ном водном растворе TWEEN 80 после 15–50 мин в зависимости от концентрации антиоксидантный эффект против перекиси водорода менялся на прооксидантный.

Таким образом, из представленных данных можно заключить, что раствор фуллерена C_{60} в оливковом масле оказывает антиоксидантное и ДНК-протекторное действие, что вероятно является причиной его геропротекторных свойств. Принимая во внимание данные о способности проникать через биологические мембраны, быть переносчиком протонов [4] и взаимодействовать со свободными радикалами, а также выводиться из организма млекопитающих в течение нескольких десятков часов [1], он может рассматриваться как митохондриально-направленный антиоксидант. Также стоит отметить, что в исследованиях биологических свойств наночастиц всегда следует принимать во внимание влияние используемых растворителей на результаты экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baati T., Bourasset F., Gharbi N. et al. // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. P. 4936–4946.
2. Oberdörster E. // *Environ. Health Perspect.* 2004. Vol. 112. P. 1058–1062.
3. Oberdörster E. et al. // *Carbon*. 2006. Vol. 44. № 6. P. 1112–1120.
4. Chistyakov V.A., Prazdnova E.V., Soldatov A.V et al. // *Int. J. Biol. Biomed. Eng.* 2014. № 8. P. 59–62.
5. Emelyantsev S. et al. // *Biosensors*. 2019. Vol. 9. № 2. P. 81.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЕСТЕСТВЕННЫХ И АНТРОПОГЕННО-ПРЕОБРАЗОВАННЫХ ПОЧВАХ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ

Ф.Д. Иванов, А.В. Горовцов

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета,
344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: fivanov@sfedu.ru

Городские территории занимают около 1 % от общей площади суши, при этом на них сконцентрировано более половины мирового населения. Города и агломерации быстро разрастаются, увеличивается число мегаполисов. Антропогенный фактор становится доминирующим среди факторов, влияющих на урбоэкосистемы. Вследствие повышенной техногенной нагрузки на сообщества значительно повышается уровень экологического риска.

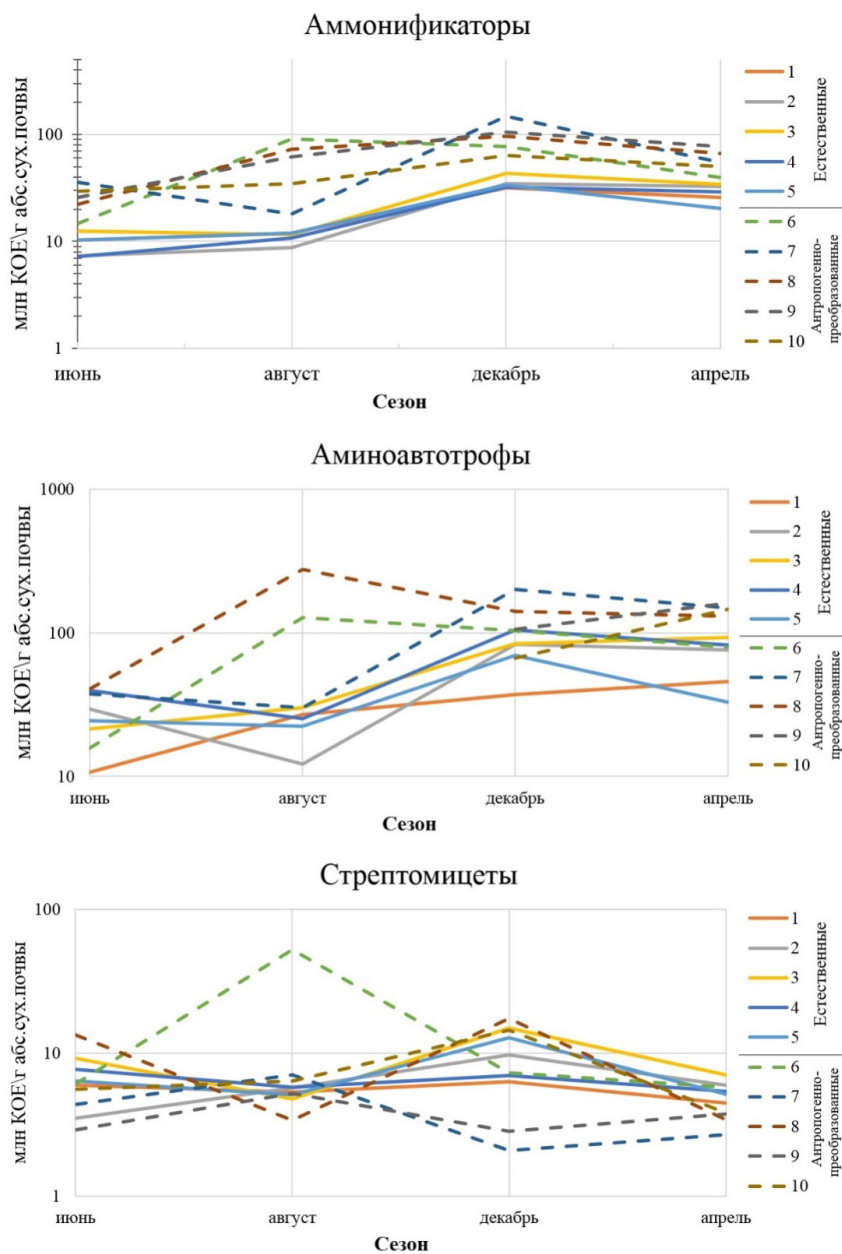


Рис. Сезонная динамика численности бактерий в почвах г. Ростова-на-Дону с разным уровнем антропогенной трансформации

Почвы как стационарный элемент экосистемы выполняют функцию буфера, фильтра и не могут избегать влияния действующих на них факторов. Ведущая роль в выполнении экологических функций почвы отводится микроорганизмам, что определяет важность исследования микробных сообществ. Подобная работа позволяет получить данные о процессе антропогенной трансформации почв и эволюции урбоэкосистем в целом.

Целью данной работы было изучить сезонную динамику численности основных групп микроорганизмов в естественных и антропогенно-преобразованных почвах на территории г. Ростова-на-Дону. Площадки № 1–5 были расположены в районах с минимально выраженным антропогенным воздействием. При выборе точки для отбора визуально оценивалось состояние растительного покрова. При этом отмечались виды, являющиеся индикаторными для ненарушенных степных фитоценозов, а именно, типчак *Festucavalesiaca*, ковыль *Stipasp.*, бельвалия сарматская *Bellevaliasarmatica* и др. Отбор проб производился из горизонта А с глубины 0–10 см.

Площадки № 6–10 были расположены на территориях в центральной части города с длительным и выраженным антропогенным урбанистическим воздействием. Район отбора этих проб характеризовался плотной застройкой, высоким уровнем автомобильного и пешеходного движения. При выборе конкретных мест отбора использовали данные многолетнего мониторинга уровня загрязнения и выпадения атмосферной пыли. Отбор проб производился из горизонта урбик с глубины 0–10 см.

По результатам изучения динамики численности аммонификаторов, аминокавотрофов и стрептомицетов в почвах города было установлено, что наиболее чётко различия между естественными и антропогенно-преобразованными почвами прослеживались для аммонификаторов, которых в естественных почвах было в среднем в 2–5 раз меньше, чем в антропогенно-преобразованных. При этом в естественных почвах для всех групп микроорганизмов и во все четыре сезона отмечалось значительно меньшее варьирование численности между точками отбора (рис.).

Таким образом, удалось показать, что, несмотря на существенное влияние сезонных факторов на почвенные микроорганизмы, численность отдельных их групп может являться надёжным индикатором состояния почв в процессе урботрансформации. Также показана резкая гетерогенность городских почв по микробиологическим показателям на фоне относительного сходства естественных микробных сообществ.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ

*Н.А. Илюшина, О.В. Егорова, Ю.А. Ревазова, Н.С. Аверьянова, Е.А. Прокофьев,
М.А. Макарова, О.О. Дмитричева, Л.А. Кара, Г.В. Масальцев, Ю.В. Сифонова*

*Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Роспотребнадзора, 141014, Российская Федерация, Московская область, городское поселение Мытищи, ул. Семашко, 2
E-mail: ilyushina-na@mail.ru*

Гербициды, используемые в сельском хозяйстве для борьбы с сорной растительностью, содержат в качестве действующих веществ соединения различных химических классов. С 70-х годов прошлого века в качестве гербицидов начали широко применять препараты на основе производных сульфонилмочевины.

Сульфонилмочевинные гербициды обладают высокой эффективностью, селективностью и низкой стойкостью в окружающей среде. Их невысокая токсичность при однократном воздействии свидетельствует о малой вероятности острого отравления при их применении [1].

Сульфонилмочевины являются ингибиторами ацетолактатсинтазы, отвечающими за биосинтез алифатических разветвленных аминокислот у двудольных растений, и нарушают деление клеток [2].

В соответствии с данными Россельхознадзора, на территории Российской Федерации разрешено к применению 108 монопрепаратов и 43 комбинированных препаративных форм пестицидов на основе производных сульфонилмочевины [3] (табл.).

Пестициды – производные сульфонилмочевины, разрешенные к применению в Российской Федерации

Действующие вещества	Количество препаративных форм	
	монопрепараты	комбинированные препараты
Римсульфурон	18	4
Метсульфурон-метил	18	3
Тифенсульфурон-метил	7	9
Трибенурон-метил	37	6
Этаметсульфурон-метил	4	1
Никосульфурон	23	9
Хлорсульфурон	1	11

Проведено исследование 14 технических продуктов действующих веществ из класса сульфонилмочевин и трёх препаративных форм, содержащих в своем составе никосульфурон, трибенурон-метил и метсульфурон-метил. Эксперименты проводили с использованием теста Эймса (OECD №471) и микроядерного теста на млекопитающих *in vivo* (OECD №474). В качестве тест-объектов использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA1535, TA100 и TA102. Хромосомные нарушения выявляли с помощью микроядерного теста *in vivo* на эритроцитах костного мозга мышей линии CD-1 обоих полов. Статистическую обработку проводили с использованием программы SPSS Statistics v.22.0 (Корпорация IBM, Нью-Йорк, США).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют об отсутствии способности исследованных технических продуктов и препаративных форм вызывать генные мутации у бактерий. В микроядерном тесте на эритроцитах костного мозга мышей *in vivo* они также не вызвали статистически значимого повышения частоты микроядер в полихроматофильных эритроцитах. Кроме того, не выявлено линейной зависимости частоты образования микроядер с увеличением дозы. Таким образом, исследованные пестициды не индуцировали кластогенный и анеугенный эффекты в условиях проведенных экспериментов.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии генотоксического действия исследуемых пестицидов и подтверждают их генетическую безопасность для нецелевых организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sarmah A. K., Sbadie J.* // Journal of agricultural and food chemistry. 2002. Vol. 50. №. 22. P. 6253–6265.
2. *Ray T.B.* // Trends in Biochemical Sciences. 1986. Vol. 11. №. 4. P. 180–183.
3. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М.: Минсельхоз России, 2018.

**ВЛИЯНИЕ ПОЛЛЮТАНТОВ
НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РИФАМПИЦИНУ
У БАКТЕРИЙ**

А.В. Каплина, Т.Н. Ажогина, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: akaplina@sfedu.ru

В современном мире обострилась проблема антибиотикорезистентности, что приносит огромный ущерб сфере экономики и медицины. В окружающую среду антибиотики и гены устойчивости к

антибиотикам попадают различными путями. В основном это сточные воды очистных сооружений, стоки предприятий промышленности, сельского хозяйства, животноводства и предприятий аквакультуры [1]. Устойчивые к антибиотикам бактерии встречаются повсеместно, в том числе в экосистемах, подверженных высокому уровню антропогенной нагрузки. В связи с этим представляет интерес изучение влияния поллютантов на распространение антибиотикорезистентности среди бактерий в природе.

Целью данного исследования было изучение влияния ряда поллютантов (декан, гексадекан, дизельное топливо, циклогексан, бензол) на формирование резистентности у бактерий к рифампицину.

В экспериментах использовался штамм *Ps. putida* 8a do, выделенный сотрудниками лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ из почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС [2]. В качестве модельного антибиотика, который способствует возникновению резистентности, использовался рифампицин. Для получения рифампицин-устойчивых мутантов микроорганизмов использовалась методика Jatsenko [3].

В результате исследования была выявлена достоверная зависимость частоты встречаемости рифампицин-устойчивых мутантов *Ps. putida* 8a do от присутствия в среде некоторых исследуемых веществ.

Выраженный мутагенный эффект оказали следующие вещества: декан в концентрациях 0,01 %, 0,1 %, 0,5 %; гексадекан – 0,5 % и 1 %; циклогексан – 0,2 %; бензол – 0,05 %.

Дизельное топливо 0,1 %, 0,5 % и 1 %, а также бензол в концентрации 0,01 %, напротив, оказали подавляющее воздействие на мутагенез.

Гексадекан 0,01 %, 0,1 %, ДТ 0,01 %, циклогексан 0,02 %, 1 %, 2 %, бензол 0,25 % не оказали влияния на мутагенез *Ps. putida* 8a do.

Таким образом, полученные результаты показали, что исследованные углеводороды в определенных концентрациях способны стимулировать образование мутантов *Ps. putida* 8a do, устойчивых к рифампицину. В окружающей среде эти вещества могут способствовать распространению лекарственной устойчивости в микробных сообществах. В связи с этим необходимо проведение дальнейших исследований с использованием различных поллютантов и бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сазыкина М.А., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е. и др. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2016. Т.12. № 2. С. 30–40.
2. Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. // Мат-лы II Междунар. (XV Региональной) науч. конф. «Техногенные системы и экологический риск» (г. Обнинск, 19–21 апреля 2018 г.). Обнинск, 2018. С. 247–248.
3. Jatsenko T., Tover A., Tegova R., Kivisaar M. // Mutation Research. 2010. Vol. 683. P. 106–114.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-00787, Министерства образования и науки РФ (грант № 6.2379.2017/ПЧ).

ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ И АНТИБИОТИКОВ НА ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ПОЧВ МОДЕЛЬНЫХ МИКРОКОСМОВ

Ш.К. Карчава, М.В. Климова, Е.М. Кудеевская, Т.Н. Ажогина, А.В. Гильдебрант

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: lovecharli@mail.ru; juravliova.mascha@mail.ru; levii4atelena@mail.ru; t.azhogina@mail.ru; siniamida1@yandex.ru

Одним из масштабных источников загрязнения окружающей среды являются продукты хозяйственной деятельности человека – твёрдые бытовые отходы (ТБО). Токсичные вещества со стоками

ТБО попадают в почву, открытые водоемы и грунтовые воды [1]. Наиболее опасные последствия их воздействия – загрязнение генотоксинами.

Целью работы была оценка генотоксичности почв ТБО под влиянием углеводов и антибиотиков в эксперименте с модельными микроекосмами. Почвы для закладки микроекосмов были отобраны в марте–апреле 2018 г. на полигонах твёрдых бытовых отходов в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области, а также на условно-чистой территории. В опытном варианте в микроекосмы было внесено дизельное топливо в количестве 2 объемных % и антибиотики ампициллин и цефазолин (25 мг на литр почвы).

Для тестирования генотоксичности образцов почв микроекосмов в течение шести месяцев их инкубации использовали цельноклеточные бактериальные сенсоры на основе люминесцентных бактерий. В настоящее время цельноклеточные lux-биосенсоры являются ценным инструментом, позволяющим осуществлять эффективный контроль за качеством и безопасностью окружающей среды [2]. Для контроля генотоксичности использовались биосенсоры *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) и *E. coli* MG1655 (pCoD-lux). Мерой токсичности служил фактор индукции (I), рассчитываемый как отношение биолюминесценции опытной пробы к биолюминесценции контрольной пробы. При достоверном отличии опыта от контроля $I < 2$, обнаруженный токсический эффект оценивался как «слабый». При $2 \leq I \leq 10$ – как «средний». При $I > 10$ – как «сильный».

Исследования при помощи обоих биосенсоров показали, что генотоксичность почв всех микроекосмов обусловлена практически полностью прямыми мутагенами. В начале эксперимента почвы микроекосмов показали низкий уровень генотоксичности. Затем был зарегистрирован генотоксический эффект средней величины. Первый уровень подъёма генотоксичности был отмечен в первый и второй месяц инкубации. Максимальный уровень значений генотоксичности был достигнут после шести месяцев инкубации. Таким образом, степень генотоксичности почв микроекосмов за время инкубации увеличилась в контроле и опыте всех микроекосмов и достигла средней степени генотоксичности. При этом максимальное возрастание уровня генотоксичности было зарегистрировано в почвах микроекосмов ТБО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stein R. // Recycling Today Global Edition. 2012. Vol. 5. № 6. P. 36–40.
2. Сазыкина И.С., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е. и др. // Валеология. 2016. № 4. С. 5–12.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 6.2379.2017/ПЧ; и РФФИ (грант № 17-04-00787 А).

ТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ 2,2'-БИС(БИЦИКЛО[2.2.1]ГЕПТАНА) НА ЖИВЫЕ КЛЕТКИ

***А.Г. Кессених¹, Э. Ваганова¹, А.В. Баранова¹, М.В. Бермешев³, В.Г. Певгов¹,
В.О. Самойлов³, С.В. Шорунов³, Л.С. Ягужинский¹, А.Л. Максимов³, И.В. Манухов^{1,2}***

¹Московский физико-технический институт (государственный университет), 141701, Российская Федерация, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (ГосНИИГенетика), 117545, Российская Федерация, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

³Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, 119991, г. Москва, Ленинский пр., 29
E-mail: Tiflinger@yandex.ru

Соединение, имеющее элементы с напряжённой структурой 2,2'-бис(бицикло[2.2.1]гептана) (БЦГ) является перспективным соединением с точки зрения использования в ракетной технике в качестве

топливного компонента для жидкостных ракетных двигателей. Предполагается, что применение соединений, подобных БЦГ, позволит добиться эффективности в удельном импульсе, сравнимой с таковой компонента ракетного топлива несимметричного диметил гидразина (НДМГ), существенно снизив при этом токсикологические нагрузки на окружающую среду и персонал, работающий с ракетной техникой.

В настоящей работе проведено исследование токсичности БЦГ с использованием бактериальных lux-биосенсоров. Для данных исследований БЦГ был получен из 5-винил-2-норборнена согласно [1]. Молекула БЦГ содержит два элемента с напряженной структурой и состоит из 14 атомов углерода и 22 атомов водорода (рис.).

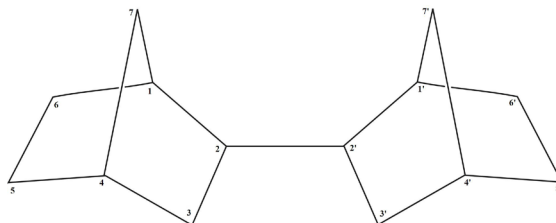


Рис. Структурная схема молекулы 2,2'-бис(бицикло[2.2.1]гептана)

Исследование механизмов генотоксичности проводилось с использованием цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров. Lux-биосенсоры – это клетки *Escherichia coli* трансформированные гибридными плазмидами, содержащими в своём составе последовательности *luxCDABE* генов из *Photorhabdus luminescense* под контролем различных стрессовых индуцируемых промоторов [2, 3]. В частности, использовались конструкции pAlkA-lux, pOxyS-lux, pSoxS-lux и pColD-lux, отвечающие на алкилирование ДНК, окислительные повреждения и на повреждения ДНК, вызывающие SOS-ответ, соответственно. Подобные lux-биосенсоры использовались ранее для исследования генотоксичности НДМГ [4, 5].

Показано, что инкубация биосенсорных клеток *E. coli* MG1655 (pColD-lux) с БЦГ в концентрации 10 г/л приводит к индукции люминесценции примерно в 20 раз, что свидетельствует о высоком уровне повреждений ДНК, и, как следствие, возникновению SOS-ответа. Использование lux-биосенсоров показало, что помимо SOS-ответа, имеет место окислительное воздействие на клетки. Алкилирующего воздействия, тестируемого с помощью штамма *E. coli* MG1655 (pAlkA-lux), исследуемое вещество не проявило. Окислительный стресс в ответ на воздействие БЦГ определялся с помощью клеток *E. coli* MG1655 с плазмидами pOxyS-lux или pSoxS-lux, способными детектировать появление внутриклеточной перекиси водорода и супероксид-анион-радикала, соответственно. Оба варианта показали ответ на появление БЦГ в среде. Наибольшая токсичность определяется по механизму образования супероксид-анион-радикала и детектируется lux-биосенсором *E. coli* pSoxS-lux, в котором гены бактериальных люцифераз транскрипционно шиты с промотором гена *soxS*. Полученные данные свидетельствуют о том, что окисление БЦГ приводит к образованию активных форм кислорода, которые, попадая в клетку или образуясь в ней, дают основной вклад в токсичность данного вещества.

Предполагается, что генотоксичность БЦГ определяется появлением супероксид-анион-радикала и других активных форм кислорода, повреждающих ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bermeshev M.V., Antonova T.N., Shangareev D.R. et al. // Pet. Chem. 2018. Vol. 58 (10). P. 869–875.
2. Van Dyk T.K., Majarian W.R., Konstantinov K.B. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. Vol. 60. P. 1414–1420.
3. Кессених А.Г., Манухов И.В., Ваганова Э.Р. и др. Патент РФ № 2626569 от 17.12.2015 по теме: «Набор lux-биосенсоров для детекции токсичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина в среде».
4. Zavgelsky G.B., Kotova V.Yu., and Manukhov I.V. // Mutation Research. 2007. Dec 1. Vol. 634 (1–2). P. 172–176.
5. Горянин И.И., Котова В.Ю., Краснопеева Е.Д. и др. // Труды МФТИ. 2013. Т. 5, № 1 (17). С. 103–111.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI60417X0181, соглашение №14.604.21.0181 от 26.09.2017).

АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ ПОЛИГОНОВ ТВЁРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

М.В. Климова, Ш.К. Карчава, Е.М. Кудеевская, Т.Н. Ажогина, А.В. Гильдебрант

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: juravliova.mascha@mail.ru; lovecharli@mail.ru; levii4atelena@mail.ru; t.azhogina@mail.ru; siniamida1@yandex.ru.

В настоящее время неизбежно растёт количество бытовых и промышленных отходов жизнедеятельности человека. В связи с этим проблеме бытовых отходов посвящается большое количество исследований [1]. В частности, особую актуальность приобретает экологический контроль состояния полигонов твёрдых бытовых отходов (ТБО) и свалок с целью оценки опасности для окружающей среды и здоровья человека.

Материалом исследований служили образцы почв, отобранные в 2017 г. на полигонах ТБО г. Ростова-на-Дону и его окрестностей: Левенцовский полигон ТБО (закрыт); Самарский полигон ТБО; п. Воронцовка; полигон ТБО на Военведе (закрыт); полигон ТБО между районами «Северный» и «Военвед» (закрыт недавно); полигон ТБО п. Воронцовка.

Для оценки генотоксичности почв полигонов ТБО г. Ростова-на-Дону был использован метод биотестирования на основе бактериальных lux-биосенсоров (*E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pColD-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux)). Данный метод позволяет быстро и эффективно оценивать присутствие ДНР-тропных веществ и веществ, вызывающих окислительный стресс [2]. Мерой токсичности служил фактор индукции (I), рассчитываемый как отношение величины биолюминесценции опытной пробы к величине биолюминесценции контрольной пробы. При достоверном отличии опыта от контроля $I < 2$ оценивали как «слабый» токсический эффект, $2 \leq I \leq 10$ - «средний», $I > 10$ - «сильный».

Тестирование со штаммом *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) показало, что генотоксический эффект был зарегистрирован как без использования, так и с использованием метаболической активации, что свидетельствует о наличии промутагенных веществ и мутагенных веществ прямого действия. Был зафиксирован генотоксический эффект слабой и средней силы в пяти из семи исследованных образцов почв полигонов ТБО. Исследование почв полигонов ТБО с помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD-lux) выявило в четырёх из семи образцов генотоксичные эффекты при использовании метаболической активации. При этом в изучаемых пробах преобладали вещества промутагенной природы. Максимальный фактор индукции $1,95 \pm 0,17$ в пробе, отобранной на полигоне ТБО на Военведе.

Ответ на окислительный стресс, вызываемый появлением в среде перекиси водорода, зарегистрирован при помощи биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) в шести из семи образцов почв полигонов ТБО. В пяти образцах почв фактор индукции варьировал от $2,46 \pm 0,09$ до $2,97 \pm 0,16$, что говорит о среднем токсическом эффекте. В одном образце зафиксирован слабый эффект токсичности.

Биолюминесцентный ответ биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux), реагирующего на содержание веществ, вызывающих образование супероксид-аниона, был зарегистрирован в трёх образцах грунтов и оценивался как слабый токсический эффект.

Полученные результаты свидетельствуют о присутствии в большинстве образцов почв полигонов ТБО ДНК-тропных веществ и веществ, вызывающих окислительный стресс. Учитывая актуальность проблемы загрязнения окружающей среды токсичными соединениями, необходим длительный контроль за их содержанием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stein R. // Recycling Today Global Edition. 2012. Vol. 5, № 6. P. 36–40.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ проект № 6.2379.2017/ПЧ; РФФИ проекта № 17-04-00787 А.

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В АНТРОПОГЕННО-ПРЕОБРАЗОВАННЫХ ПОЧВАХ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ

С.В. Козьменко, А.В. Горовцов

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: kozmenko@sfnedu.ru; gorovtsov@gmail.com

Микробное сообщество почв представляет собой сложно организованную структуру, в которой существуют определённые закономерности. Бактерии очень сильно подвержены влиянию факторов окружающей среды, что делает их хорошими индикаторами состояния почв.

Учитывая масштабы развития хозяйственной деятельности человека и её влияние на окружающую среду очень важно своевременно производить мониторинг её состояния. Оценка состояния биоценозов городов позволит минимизировать негативные последствия как для окружающей среды, так и для человека. Особый интерес в качестве объекта исследования представляют спорообразующие бактерии рода *Bacillus*.

Нами было исследовано 40 почвенных образцов с 10 точек, пять из которых находились в центре города, остальные пять – за чертой города. Отбор проб производился в июне, августе, декабре и апреле. Количественный учет численности бацилл позволяет выявить следующие закономерности: общая численность бацилл в городских почвах по сравнению с естественными больше; пик численности наблюдается в апреле; наиболее сильные сезонные колебания численности наблюдаются в городских образцах (табл.).

Таблица

Сезонная динамика численности представителей рода *Bacillus* в почвах города Ростова-на-Дону (в млн. КОЕ на г абс. сухой почвы)

№ образца		Июнь	Август	Декабрь	Апрель
Низкая нагрузка	1	1,57±0,30	2,18±0,43	2,53±0,20	1,59±0,49
	2	2,09±0,11	3,51±0,21	5,62±0,59	4,39±0,48
	3	2,85±0,16	3,17±0,18	3,75±0,23	4,36±0,46
	4	3,53±0,19	2,51±0,19	3,63±0,42	3,65±0,16
	5	1,99±0,13	3,39±0,29	4,11±0,10	2,61±0,40
Высокая нагрузка	6	1,44±0,14	0,85±0,17	2,21±0,16	3,25±0,62
	7	1,12±0,23	2,03±0,66	1,09±0,29	1,69±0,19
	8	1,11±0,16	1,37±0,19	2,18±0,39	1,62±0,32
	9	0,30±0,03	1,40±0,47	0,98±0,17	1,53±0,24
	10	0,68±0,14	1,45±0,34	1,91±0,35	2,29±0,14

По данным графика (рис.) видно, что во все сезоны численность спорообразующих бактерий достоверно выше в почвах с низкой степенью антропогенной нагрузки. Наибольшая разница между городскими и естественными почвами наблюдается в июне (численность бактерий в естественных почвах больше в 2,6 раз). В августе и декабре разница остается всё ещё высокой, но к апрелю практически сглаживается (численность бактерий в городских почвах в 1,6 меньше, чем в естественных). Тем не менее, во все исследованные сезоны выявленные различия были статистически достоверны при $p < 0,05$.

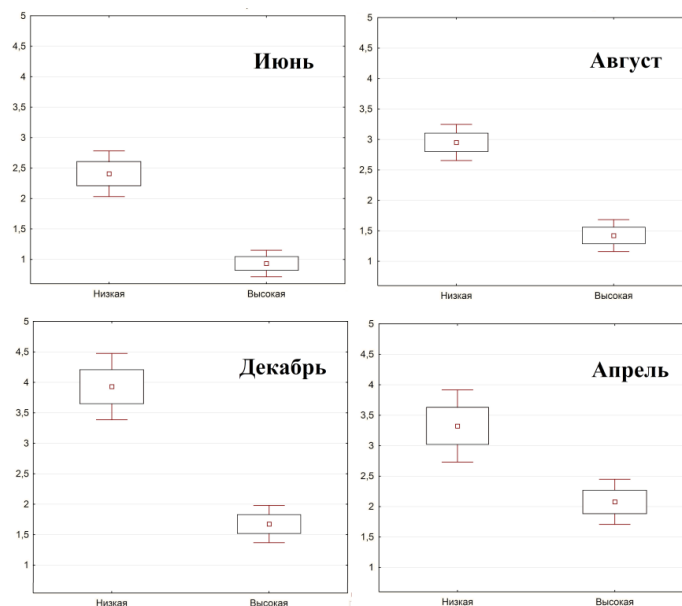


Рис. Сравнение численности спорообразующих бактерий в городских и естественных почвах в различные сезоны

Сходные данные получены в работе [1]. Показано что численность представителей рода *Bacillus* и актиномицетов противоположна общей численности микроорганизмов по признаку распределения и удалённости от центра города. Доля этих микроорганизмов минимальна в посевах почв, отобранных из периферических точек.

Таким образом, снижение численности спорообразующих бактерий является надежным критерием, позволяющим оценивать выраженность антропогенной трансформации почв в условиях города.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинникова Т.А., Панкратов Т.А. // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2008. Т. 17, №. 2. С. 373–383.

МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ОЗЕРА ФАУСТА, О. КУНАШИР, РОССИЯ

А.В. Коржук^{1,2}, А.С. Розанов¹, С.Е. Пельтек¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10

²Новосибирский государственный университет, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

E-mail: korzhuk.anton@gmail.com; sibiryak.n@gmail.com; peltek@bionet.nsc.ru

Микробная жизнь в геотермальных водах обнаружена еще в 1903 г., но возможность изучения её в полной мере появилась только с развитием молекулярно-биологических методов. Микроорганизмы, живущие в экстремальных условиях, создают различные метаболические системы, адаптированные к конкретным факторам окружающей среды, что делает термофилов и их термостабильные белки перспективными для промышленных и биотехнологических применений. Помимо этого, изучение

микробных сообществ геотермальных источников интересно с филогенетической точки зрения, оно обогащает фундаментальные знания о биологическом разнообразии планеты.

Южно-Курильские острова являются одним из самых труднодоступных территорий России и мира из-за действующего на их территории пограничного режима. Отчасти поэтому микробные сообщества геотермальных источников Южных Курил практически не изучались микробиологически и совсем не изучались при помощи метагеномных подходов. Используемый нами метод полногеномного метагеномного секвенирования не применялся ранее в России для исследования природных объектов.

В 2017 г. сотрудниками ИЦиГ СО РАН была организована поездка для изучения геотермальных источников острова Кунашир. Одним из интереснейших объектов для изучения микробного разнообразия оказалось озеро Фауста ($t = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2.0$). Было выполнено полногеномное метагеномное секвенирование микробного сообщества, расположенного на поверхности донных отложений. Основным продуцентом сообщества является микроскопическая ацидофильная красная водоросль из семейства *Cyanodiaceae*, она придает воде данного озера изумрудный цвет. Бактерии представлены типами *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus* и др., археи – в основном *Euryarchaeota*. Анализ выделенных геномов показал наличие новых видов бактерий и архей.

Работа поддержана бюджетным проектом № 0324-2019-0040.

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНА *ARDB* ИЗ КОНЬЮГАТИВНОЙ ПЛАЗМИДЫ R64. АНТИРЕСТРИКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МУТАНТОВ

А.А. Кудрявцева¹, И.В. Манухов^{1,2}, Г.Б. Завильгельский²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет), 141701, Российская Федерация, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов «ГосНИИгенетика», 117545, Российская Федерация, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

E-mail: kudryavtseva@phystech.edu; manukhovi@mail.ru; zavilgel@genetika.ru

В работе изучали влияние мутаций по высоко консервативным аминокислотам на антирестрикционную активность белка ArdB.

Был проведён сравнительный анализ последовательности девяти гомологов гена *ardB*. Оказалось, что высококонсервативными являются: R16, F19, P21, F24, G25, E32, Y46, G48, G49, W51, L56, N77, S84, G86, I87, E132, I136, D141 (нумерация приведена по *ardB* из R64). Далее с использованием сервиса STRUM [1] был проведён анализ влияния консервативных аминокислот на образование третичной структуры ArdB. Для дальнейшего анализа были выбраны консервативные аминокислоты, предположительно не влияющие на структуру глобулы. Такие консервативные аминокислоты расположены на поверхности белковой глобулы и могут влиять на взаимодействие с другими внутриклеточными факторами антирестрикционного процесса: R16, E32, S84, E132, N77, D141.

Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные копии гена *ardB*, кодирующие замены по интересующим аминокислотам: D141E, D141T, ΔD141, D141N, N74A, S84L, E132A, R16A, E32A.

Антирестрикционную активность штаммов *E. coli* AB1157, содержащих плазмиды с соответствующими мутантными копиями гена *ardB*, проверяли по эффективности посева немодифицированного фага λ_0 на клетках. Из данных, представленных в таблице, видно, что присутствие в штамме AB1157 плазмиды с нативным геном *ardB* под промотором P_{lac} увеличивает эффективность посева фага λ_0 примерно на четыре порядка. Ген *ardB*, кодирующий делеционный по

концевой аминокислоте D141 вариант белка, полностью утратил антирестрикционную активность (снижение уровня эффективности посева λ_0 примерно на четыре порядка – табл.). К полной потере антирестрикционной активности белка ArdB приводит также замена D141T неполярной аминокислотой (треонин) и полярным, но незаряженным, аспарагином (D141N), что указывает на важность отрицательного заряда на С-конце антирестриктазы. Значимость С-концевого заряда дополнительно проверяли, используя мутантный белок ArdB с заменой аспарагиновой кислоты на глутаминовую (D141E). В результате антирестрикционная активность мутантного белка ArdB D141E снизилась примерно в 30 раз (табл.). Таким образом, для проявления белком ArdB антирестрикционной активности требуется не только отрицательный заряд на С-конце, большое значение имеет также длина бокового радикала. Длина бокового радикала заряженного остатка может влиять на энергию ион-парного взаимодействия или на прочность образуемого комплекса с ионом металла.

Таблица

Антирестрикционная активность ArdB R64

Плазмида в <i>E. coli</i> AB1157	ЕОР λ_0 фага*	Антирестрикционный фенотип
без плазмиды	1	–
pTZ57R (вектор)	1,05	–
pYfeB (нативный <i>ardB</i>)	9823	+
pYfeBrev	0,73	–
pYfeB–D141E	298	+/-
pYfeB–D141T	1,1	–
pYfeB– Δ D141	0,93	–
pYfeB–D141N	0,76	–
pYfeB–N74A	463	+/-
pYfeB–S84L	200	+/-
pYfeB–E132A	135	+/-
pYfeB–R16A	4000	+
pYfeB–E32A	100	+/-

*Представлены средние значения пяти независимых экспериментов.

Стандартное отклонение не превышало 25 %.

Эффективность посева фага λ_0 на штамме без плазмиды принята за 1.

Замена отрицательно заряженных консервативных аминокислот E32 и E132 на гидрофобный аланин приводит к существенному снижению антирестрикционной активности ArdB (примерно в 100 раз). Замена серина S84 на лейцин снижает эффективность посева фага λ_0 примерно в 40 раз. Замена же положительно заряженного аргинина R16 на аланин практически не привела к снижению активности ArdB.

Антирестрикционная активность белка ArdB зависит от концентрации в клетке [2]. Для того, чтобы показать, что изученные мутации не ведут к снижению экспрессии белка ArdB, все гены *ardB* и их мутантные формы были переклонированы под T7 промотор. Мутации по выбранным аминокислотам не приводят к снижению экспрессии белка ArdB, а, значит, снижение антирестрикционной активности мутантов вызвано не уменьшением концентрации ArdB в клетке, а изменением поверхности третичной структуры.

В результате данной работы было показано, что С-концевой остаток D141 – ключевой для проявления антирестрикционной активности белка ArdB, консервативный участок на поверхности глобулы, состоящий из N74 и D141, можно считать “ключевым участком” ArdB. Жёсткая консервативность, а также строгая необходимость сохранения заряда в этом участке ArdB позволяют предположить, что концевые D141 и N74 участвуют в формировании комплекса ArdB с другими факторами, вовлечёнными в ингибирование рестрикционной (эндонуклеазной) активности систем рестрикции-модификации типа I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Quan L., Lv Q., Zhang Y. // Bioinformatics. 2016. Vol. 32 (19). P. 2936–2946. Doi:10.1093/bioinformatics/btw361.
2. Goryanin I.I., Kudryavtseva A.A., Balabanov V.P. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2018. Vol. 365. № 23. fny227.

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И МАРКЕРА ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА (МДА) У БЫЧКОВЫХ РЫБ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ

Т.В. Кузина¹, А.В. Кузин²

¹Астраханский государственный университет, 414000, Российская Федерация, г. Астрахань, пл. Шаумяна.

²ООО «ЛУКОЙЛ-Нижневолжскнефть», 414000, Российская Федерация, г. Астрахань, ул. Адмиралтейская, 1, корп. 2

E-mail: tatuls@mail.ru

Важными задачами эколого-генетического мониторинга являются оценка и последующее длительное динамическое наблюдение за возможными отрицательными генетическими последствиями воздействия поллютантов на определённые звенья метаболизма. Цитогенетические и биохимические биомаркеры используются в биомониторинговых исследованиях с целью оценки генотоксичности загрязняющих факторов водной среды. В результате оценки цитогенетических нарушений в крови бычковых рыб, выловленных на мелководных и глубоководных станциях Северного Каспия была выявлена корреляционная зависимость между эритроцитами с микроядрами (МЯ) и эритроцитами с суммированным количеством нарушений ядра, такими как кариорексис, пикноз и кариолизис $R = -0,83$ ($p < 0,05$). Образование МЯ в данном случае можно рассматривать как результат (и вариант) адаптивных процессов. Чем больше клеток с предшествующими повреждениями (кариорексис, кариопикноз), тем меньше клеток с микроядрами. На рисунке представлена динамика накопления маркера оксидативного стресса малонового диальдегида (МДА) в печени бычковых рыб и МЯ в эритроцитах периферической крови за 2017–2018 гг. С помощью регрессионного анализа построена трендовая модель с коэффициентом аппроксимации $R^2 = 0,9468$.

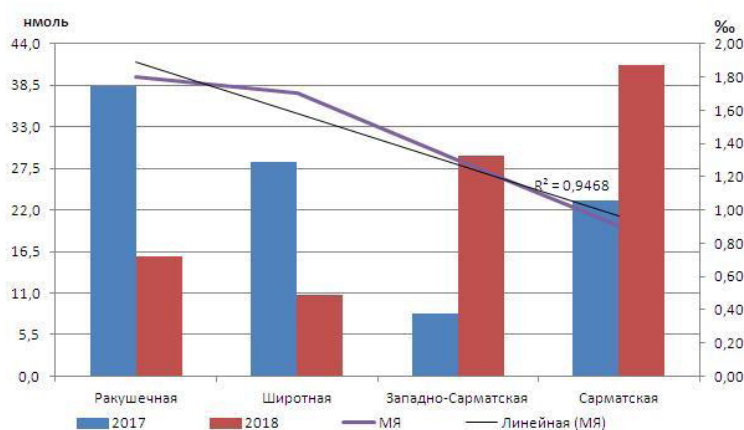


Рис. Динамика накопления МДА в печени и МЯ в эритроцитах бычковых рыб Северного Каспия

Увеличенное образование свободных радикалов в организме и связанное с этим усиление процессов пероксидации липидов сопровождается рядом нарушений в функционировании клеток. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) сопровождается окислением тиоловых (сульфгидрильных) групп мембранных белков. А причиной патологических митозов при канцерогенезе может быть повреждение в соответствующих клетках тиолового механизма сборки митотического аппарата, вызванное пероксидативными условиями в них. Липидные радикалы и продукты ПОЛ могут, по-

видимому, непосредственно воздействовать на тиоловые группы белков и на указанный механизм, нарушая цитоскелет, сборку белков митотического аппарата в ориентированную систему веретена деления, а также деление центриолей и расхождение хромосом. В результате могут образовываться микроядра при конденсации хромосомных фрагментов или целых хромосом, которые не включены в основанное ядро после анафазы аномального митоза. Таким образом, соматический мутагенез (образование микроядер) после воздействия свободных радикалов может являться адаптивной реакцией на условия окружающей среды, имеющие генотоксический эффект. И учёт этих показателей (или возможность использования только одного) при экологическом мониторинге может дать ответ на способность гидробионтов адаптироваться в меняющихся условиях водной среды в местах с повышенной антропогенной нагрузкой.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К БЕТА-ЛАКТАМАМ У ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ШТАММОВ *Klebsiella spp.*

И.О. Покудина¹, М.А. Федорова², А.М.А. Аль-Джавади¹

¹Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²ООО «Наука», Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, Тургеневская, 49

E-mail: ipokudina@mail.ru.

В настоящее время распространение устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий вызывает чрезвычайную озабоченность и признаётся угрозой для общественного здравоохранения. Широкое использование противомикробных препаратов в здравоохранении и сельском хозяйстве в сочетании с глобальными перемещениями людей, животных и продуктов питания, являющихся результатом индустриализации в мире, создают разнообразие и уровень устойчивости, не наблюдавшиеся ранее. Для контроля потребуются глобальные скоординированные меры, аналогичные тем, которые необходимы для смягчения последствий климатических изменений [1].

Традиционно борьба с развитием резистентности к антибиотикам в основном происходила в клинических и амбулаторных направлениях, нацеленных на сокращение передачи и предотвращение отбора устойчивых бактерий во время лечения антибиотиками. В последние годы всё чаще признаётся роль окружающей среды как важного источника и пути распространения резистентности, отмечается увеличение количества генов устойчивости и мобильных генетических элементов в сельскохозяйственных почвах, питьевой и сточных водах, воздухе.

Бета-лактамы антибиотики (БЛА) являются одними из наиболее эффективных противомикробных препаратов, используемых в клинической практике человека и животных. Однако способность микроорганизмов вырабатывать гидролитические ферменты β -лактамазы, придающие устойчивость бактериям ко многим, а в некоторых случаях ко всем β -лактамам является, причиной неудач в терапии и имеет серьезные последствия для инфекционного контроля. В настоящее время проблема устойчивости касается не только внутрибольничных, но и внебольничных инфекций, так как β -лактамазы часто обнаруживаются у возбудителей внебольничных инфекций, являющихся потенциальным источником детерминант резистентности [2].

Широкое распространение β -лактамаз и возникновение множественной резистентности обуславливает необходимость одновременного определения нескольких генов, а также мутаций в них [3].

Целью нашего исследования было определение частоты встречаемости и типов бета-лактамаз (TEM, CTX и DNA) у внебольничных штаммов *Klebsiella spp.* с фенотипом устойчивости к бета-лактамам.

Скрининг резистентных к БЛА бактерий проводился путём посева биоматериала на питательные среды традиционным микробиологическим методом и последующим исследованием чувствительности

к БЛА диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон. В исследование были включены образцы ДНК 76 изолятов *Klebsiella spp.* со сниженной чувствительностью хотя бы к одному из БЛА группы пенициллинов (амоксциллин/клавулановой кислоте, ампициллину, амоксициллину, оксациллину, пиперациллину/тазобактаму) или цефалоспорином I–IV поколения (цефотаксиму, цефтриаксону, цефепиму, цефтазидину, цефазолину, цефуроксиму, цефоперазону) до уровня, предлагаемого Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США – CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution, 2015).

Гены β-лактамаз *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM-1,2}, *bla*_{DHA} выявлялись методом ПЦР в реальном времени с использованием ПЦР наборов ООО НПО «Литех» для обнаружения генетически обусловленной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам формата «OneStep».

Анализ профилей чувствительности исследованных штаммов позволил выявить высокий уровень резистентности к БЛА исследованных образцов. Устойчивость к пенициллинам была детектирована у 74 (97,3 %) изолятов *Klebsiella spp.*, к цефалоспорином I – IV поколения, а также к обеим группам БЛА у 28 (36,8 %) исследуемых штаммов.

Известно, что гены β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) в основном кодируются плазмидами, и большинство из них можно разделить на три генотипа: TEM (резистентность к пенициллинам), SHV и CTX-M (резистентность к цефалоспорином). В нашем исследовании ген *bla*_{TEM-1,2} детектирован у 22 (28,9 %) изолятов, ген *bla*_{CTX-M} обнаружен у 30 (39,4 %).

Некоторые гены β-лактамаз AmpC-типа, в частности *bla*_{DHA}, широко распространены во всём мире, как в изолятах, выделенных у человека, так и у животных. Благодаря высоким уровням экспрессии ферментов AmpC бактерии устойчивы к пенициллинам, цефалоспорином I, II и III, цефамицинам, монобактамам и ингибиторам ферментов; поэтому многочисленные исследования сосредоточены на этом ферменте [4]. Среди исследованных изолятов *Klebsiella spp.* ген *bla*_{DHA} был обнаружен у 4 (5,2 %) образцов.

Следует отметить, что наличие одного из исследованных генов было установлено у 26 (35 %) изолятов *Klebsiella spp.*, двух – у 10 (13 %) и трёх генов одновременно – у двух штаммов.

Результаты исследования показывают, широкое распространение генов устойчивости к БЛА у внебольничных штаммов *Klebsiella sp.*, которая является одной из наиболее частых причин серьезных бактериальных инфекций у людей, как в стационарах, так и среди населения в амбулаторных условиях, и обладает очень эффективными механизмами генетического обмена [4]. Появление полирезистентных патогенов в амбулаторных условиях и наличие у них генов β-лактамазы представляет собой серьёзную проблему в борьбе с инфекциями и является фактором риска для дальнейшего распространения множественной лекарственной устойчивости к различным классам антибиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hawkey P.M. // J. Antimicrob. Chemother. 2018. Aug 1. Doi: 10.1093/jac/dky277. [Epub ahead of print]
2. Sima Tokajian, Jonathan A. Eisen, Guillaume Jospin et al. // Genome Announc. 2016. Jan-Feb. Vol. 4 (1).
3. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Бахман Т.Т. и др. // Успехи биологической химии. 2010. Т. 50. С. 303–348
4. Schluter A., Nordmann P., Bonnin R.A. et al. // Antimicrob Agents Chemother 2014. Vol. 58. P. 3768–3773.

Исследование выполнено в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ по теме: «Исследования функциональной роли генетических полиморфизмов и микроРНК в геноме человека и животных», проект № 6.6762.2017 БЧ.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМА ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

А.В. Полякова, Е.Е. Никитова

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: avpolyk@rambler.ru; sobakababaka97@mail.ru

Частота появления на свет недоношенных детей в разных странах варьирует от 5 до 18 %. Средний показатель по России в 2012 г. составил 4,3 %. Эти дети характеризуются самым высоким уровнем смертности и заболеваемости в связи с незрелостью систем иммунитета [1, 2].

Заселение организма ребенка микрофлорой начинается сразу после рождения, в первые минуты после появления на свет с вдыхаемым воздухом на слизистой дыхательных путей осаждаются микроорганизмы. Формирование микробиома органов дыхания у недоношенных новорожденных чаще всего идёт с нарушением состава нормальной микрофлоры, вследствие их длительного пребывания в условиях стационара. Основная причина нарушений – заселение респираторного тракта госпитальными штаммами данного учреждения, а также увеличением доли транзиторной микрофлоры в носоглотке и бронхах [3].

Целью данного исследования было изучение состава микробиома дыхательных путей недоношенных новорожденных.

Объектом исследования были недоношенные новорожденные, находящиеся на стационарном лечении в родовспомогательных учреждениях г. Ростова-на-Дону. Материал для исследования – отделяемое зева и эндотрахеальной трубки (ЭТТ). В работе использовались микроскопический, биохимический, бактериологический методы, видовая идентификация проводилась с использованием автоматического анализатора VITEK® 2 compact.

В ходе исследования установлено, что доминирующими видами микроорганизмов, формирующих микрофлору зева, были *Staphylococcus epidermidis* (33 %), *Klebsiella pneumoniae* (18 %), *Streptococcus viridans* (14 %), *Escherichia coli* (10 %), *Enterococcus spp* (9 %). Таким образом, в заселение верхних дыхательных путей новорожденных в условиях стационара основной вклад вносят кокковые формы, также существенную роль играют микроорганизмы группы энтеробактерий.

В микрофлоре бронхов доминировали *Acinetobacter baumannii* (57 %), *Klebsiella pneumoniae* (13), *Enterococcus spp* (7), *Stenotrophomonas maltophilia* (7 %), т. е., главным образом, неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы.

Таким образом, микробиом дыхательных путей недоношенных новорожденных представлен грамположительными и грамотрицательными аэробами и анаэробами, в основном кокковыми формами и энтеробактериями, из которых 67 % не относятся к нормальной микрофлоре экотопа и обладают высоким уровнем антибиотикорезистентности.

Исследование чувствительности к антибиотикам выделенных культур показало, что наиболее эффективными по отношению к грамположительным микроорганизмам являются ванкомицин и линезолид (95 и 97 % чувствительности).

В отношении грамотрицательных бактерий наиболее активны препараты группы карбапенемов (62 %) и аминогликозидов (49–78 %).

ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ. Преждевременные роды [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth> (дата обращения 28.01.2019).
2. Скрипниченко Ю.П., Баранов И.И. // Проблемы репродукции. 2014. № 4. С. 11–14.
3. Горячкина И.С., Раданова Е.Д., Кафарская Л.И. и др. Общая микробиология. Ч. 2. Микрофлора человека. Дисбактериоз. Инфекция. Факторы патогенности микроорганизмов. Врожденный иммунитет.- изд. 2-е, испр. и доп. М.: ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет ООСЗДРАВА РФ, 2010. 108 с.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ПРОКАРИОТ – ЖЁСТКИЙ МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ К НОВЫМ ОРГАНИЧЕСКИМ СУБСТРАТАМ

И.С. Сазыкин, Л.Е. Хмелевцова, Т.Н. Ажогина, М.А. Сазыкина

*Южный федеральный университет, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: issa@sfnedu.ru*

Бактерии проявляют огромную пластичность в отношении утилизируемых субстратов. Они способны трансформировать различные типы углеводов, их галоген- и нитропроизводных, пестицидов, пластиков, таких как ПЭТ и полиэтилен и т.д. При утилизации подобных соединений бактериальные клетки, как правило, подвержены окислительному стрессу.

Маловероятно, что бактерии постоянно имеют в своем арсенале огромное количество субстрат-специфических ферментных систем для окисления каждого индивидуального соединения. Так, нефть, являющаяся ростовым субстратом для многих прокариот, содержит более 1 500 отдельных веществ. Ещё более необычно наличие ферментов, окисляющих такие субстраты, как ксенобиотики, ранее не встречавшиеся в природе.

Для большого количества оксидаз углеводов характерна нестрогая субстратная специфичность – фермент окисляет не конкретный субстрат, а группу сходных по строению веществ. При этом можно выделить оптимальный и субоптимальные субстраты. При окислении субоптимальных субстратов эти ферменты продуцируют АФК в результате большой частоты незавершенных реакций и шунтирования ферментативного цикла. АФК, производимые оксигеназами, становятся причиной окислительного стресса и роста мутагенеза в бактериальной клетке. Зарегистрированы переходные формы фермента, имеющие высокую гомологию с предковой формой, но расширившие субстратную специфичность и окисляющие новый субстрат не менее эффективно, чем старый. Именно этот процесс способен обеспечить появление ферментов, окисляющих ксенобиотики.

Способны ли процессы, повреждающие отдельные клетки, принести выгоду бактериальной популяции в целом? Может ли окислительный стресс быть адаптацией к разнообразию субстратов?

В результате проведенных нами исследований для нефтеокисляющих микроорганизмов *Achromobacter xylosoxidans* и *Acinetobacter calcoaceticus* установлено многократное увеличение активности супероксиддисмутазы и падение активности каталазы при культивировании в присутствии углеводов. Кроме того, антиоксиданты частично ингибируют биодеградацию углеводов этими бактериями.

Для видов *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter aureus*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Arthrobacter sulfonivorans*, *Isoptericola* sp., *Oerskovia turbata*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas brassicacearum* и *Pseudomonas chlororaphis* зарегистрирована генерация O_2^- при инкубации с дизельным топливом, циклоалканами, ароматическими углеводородами, алканами, а также накопление H_2O_2 при культивировании с дизельным топливом.

Также нами было установлено, что в присутствии таких углеводов, как декан, гексадекан, циклогексан, бензол, нафталин, увеличивается количество образующихся рифампицин-устойчивых мутантов *P. putida*, *A. calcoaceticus* и *Vibrio aquamarinus*.

Моноксигеназы, принадлежащие к семейству P450 (в частности, *CYP153*) найдены у многих углеводород-деградирующих микроорганизмов. Главным образом цитохромы P450, участвующие в окислении углеводов, представлены алкан-гидроксилазами, но обнаружены также цитохромы, способные окислять и ароматические углеводороды. В ходе ферментативных реакций цитохромов P450 может происходить так называемое «разобщение» цикла, когда поступление электронов, полученных от NAD(P)H, к молекулам P450, приводит к генерации супероксид-анион радикала и/или перекиси водорода вместо продуктов монооксигеназной реакции.

Для бактерии *R. erythropolis* нами была изучена экспрессия генов *CYP153*, *recA*, *sodA* и *sodC* в присутствии углеводов. Дизельное топливо, циклогексан и нафталин усиливали транскрипцию генов *CYP153*, *recA* и *sodA*, а нафталин также и гена *sodC*. Усиление экспрессии гена *recA*, синхронизированное с экспрессией цитохрома *CYP153*, позволяет судить о том, что окислительный стресс, в присутствии углеводов, приводит к повреждению ДНК. Процесс репарации ДНК стимулирует рост мутагенеза и, вероятно, усиление горизонтального переноса генов.

Усиление генерации АФК в результате окисления ксенобиотика 2,4-динитротолуола (DNT), являющегося субоптимальным субстратом, описано группой исследователей (Pérez-Pantoja с соавт.) для *Burkholderia cepacia* R34. Окислительный стресс, в свою очередь, приводил к окислительному

повреждению ДНК с образованием 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8-охоG) и усилению мутагенеза. В процессе дальнейших исследований метаболический путь окисления DNT из *B. cereacia* R34, находящийся в процессе эволюционной трансформации, был перенесен в *P. putida*. При окислении DNT повышается уровень АФК и увеличивается уровень гомологической рекомбинации. При этом не зарегистрировано индукции промотора гена *recA* и влияния АФК на уровень мутагенеза. Авторы полагают, что за счёт высокого уровня окислительно-восстановительного метаболизма, *P. putida* нивелирует негативные последствия окислительного стресса. Неясно, каким образом при окислении DNT в *P. putida* усиливаются процессы гомологичной рекомбинации без активации SOS-ответа, и как ускоряется эволюция ферментных систем и генетическая пластичность без усиления уровня мутагенеза.

Затем тот же метаболический путь из *B. cereacia* R34 был перемещен в *E. coli*. Деградация DNT в *E. coli* также привела к усилению мутагенеза, при этом не было зарегистрировано прямое повреждение ДНК и стимулирование активности промотора гена *recA*. Авторы пришли к выводу, что усиление мутагенеза происходило не за счёт непосредственного повреждения ДНК и SOS-ответа, а за счёт стресс-индуцированного снижения точности репликации ДНК.

Вероятно, у разных микроорганизмов АФК могут приводить к ускорению молекулярной эволюции при участии преимущественно различных механизмов. К примеру, у *Burkholderia* основной вклад может вносить непосредственное повреждение ДНК, у *Rhodococcus* – SOS-ответ, у *E. coli* – снижение точности репликации ДНК. Эти процессы, вероятно, не только наносят ущерб бактериальным клеткам, но также являются механизмом жёсткой адаптации к изменяющимся условиям питания и окружающей среды. В случае *P. putida* высокий уровень внутриклеточных антиоксидантов защитит бактериальную клетку от негативных последствий окислительного стресса, но он также, по всей видимости, снизит скорость изменений в ферментных системах клетки и её приспособляемость к новым субстратам.

Таким образом, окислительный стресс может приводить к ускорению эволюции ферментов и адаптации микроорганизмов к новым субстратам и экологическим нишам. Степенью мощности антиоксидантных систем, вероятно, определяется пластичность и способность к диверсификации бактериальной популяции. Исследование баланса между выживаемостью бактериальных клеток и способностью микроорганизмов осваивать новые экологические ниши пока является крайне неизученной проблемой.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-04-00787)

ТОКСИЧНОСТЬ КУРИНОГО ПОМЁТА И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕГО ПИРОУГЛЕЙ

М.А. Сазыкина, М.В. Климова, Ш.К. Карчава, М.И. Хаммами, А.А. Аль-Раммахи, И.С. Сазыкин

*Южный федеральный университет, 344090, Российская, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1
E-mail: samara@sfedu.ru*

Для улучшения физико-химических свойств почвы, уменьшения потребности в неорганических удобрениях обычно используют различные органические отходы и компост. Всё чаще для этих целей используются биочары. Биочары довольно эффективно снижают биодоступность загрязнителей и тем самым способствуют снижению токсичности почв.

Тем не менее наличие в отходах и компостах разнообразных токсичных веществ может способствовать негативному воздействию на окружающую среду и здоровье человека. Более того, во время процесса пиролиза могут образоваться загрязняющие вещества, такие как полихлорированные диоксины и фураны, полициклические ароматические углеводороды и др. Чтобы избежать поступления дополнительных поллютантов в почву вместе с биочаром, необходимо контролировать его токсичность.

Целью данной работы было исследование токсичных свойств образцов куриного помёта и экспериментальных образцов пироугля. Для эффективной экспресс-оценки качества биочаров в

работе использовался метод биотестирования на основе цельноклеточных биолюминесцентных сенсоров [1–3].

Были исследованы 9 образцов куриного помёта, а также 14 экспериментальных образцов пироугля, полученных методом пиролиза и 13 образцов, полученных методом пиролиза с химической модификацией.

Для оценки генотоксичности почв использовалась батарея lux-биосенсоров: *E. coli* MG1655 (pXen7), *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux), *E. coli* MG1655 (pGrpE-lux), *E. coli* MG1655 (pFabA-lux), *E. coli* MG1655 Z1 (pTet-lux), *E. coli* K12 JM83 (pAmpC-lux), *E. coli* MG1655 (Pmer-lux), *E. coli* MG1655 (ParsR-lux). Была проведена детекция антибиотиков β-лактамного и тетрациклинового ряда; генотоксикантов; веществ, вызывающих окислительный стресс; ртути и мышьяка; а также веществ, повреждающих белки и мембраны.

Мерой токсичности служил фактор индукции (*I*), рассчитываемый как отношение биолюминесценции опытной пробы к биолюминесценции контрольной пробы. При достоверном отличии опыта от контроля $I < 2$, обнаруженный токсический эффект оценивали как «слабый». При $2 \leq I \leq 10$ – как «средний». При $I > 10$ – как «сильный».

В результате проведённого исследования были выявлены три наиболее загрязнённых токсическими веществами образца пироугля. Они содержали генотоксические вещества, преимущественно промутагенной природы. Также в этих образцах зарегистрирован биолюминесцентный ответ сенсоров, отвечающих на присутствие веществ, вызывающих окислительный стресс, и веществ, повреждающих белки и мембраны. Токсичность данных образцов пироуглей можно объяснить использованием определённых режимов пиролиза, которые применялись для их производства. Их пиролиз проводился при более низкой температуре, способствовавшей сохранности содержащихся в курином помёте токсикантов. Либо, напротив, пиролиз проводился при более высоких температурах и в течение более длительного периода времени, что приводило к образованию токсических веществ в процессе обработки помёта. Один образец пироугля, в котором практически не выявлены токсические вещества, был получен методом пиролиза при наиболее низкой температуре, но с использованием химической модификации.

Практически для всех образцов куриного помёта отмечено загрязнение токсическими веществами. По сравнению с образцами пироуглей в них преобладали прямые мутагены и зарегистрирован более высокий уровень загрязнения ртутью, а также антибиотиками тетрациклинового и β-лактамного ряда. В образцах пироуглей антибиотики не обнаружены. По всей вероятности, это связано с процессами их деградации в процессе пиролиза.

Таким образом, результаты исследования показали, что процесс пиролиза способствует снижению токсичности образцов куриного помёта, и выявили условия пиролиза, оптимальные для производства наименее токсичных образцов пироугля.

ЛИТЕРАТУРА

- Elad T., Benovich E., Magrisso S., Belkin S. // Environ Sci Technol. 2008. Vol. 42 (22). P. 8486–8491.*
4. *Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khammami M.I. et al. // Environ. Monit. Assess. 2015. Vol. 187 (5). P. 4406.*
 5. *Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E. et al. // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2016. Vol. 13 (3). P. 945–954.*

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 6.2379.2017/ПЧ), РФФИ (проект № 17-04-00787).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ АНАЛИЗА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ *Sinorhizobium meliloti*

А.С. Саксаганская, М.Е. Черкасова, В.С. Мунтян, М.Л. Румянцева

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, 19660, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пушкин-8, 8 ш. Подбельского, 3
E-mail: allasaksaganskaya@mail.ru; mariiacherkasova@mail.ru; vucovar@yandex.ru; mroumiantseva@yandex.ru

Выявление высокоэффективных штаммов *Sinorhizobium meliloti* – симбионтов люцерны, перспективных для производства биопрепаратов, – это длительный и трудоёмкий процесс от момента выделения штамма до получения воспроизводимых данных о его симбиотической активности в условиях микровегетационных, деляночных и полевых опытов. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных подходов может являться использование молекулярно-генетических маркеров для направленного поиска симбиотически активных штаммов.

В данной работе представлены результаты выявления и анализа двух высокоэффективных штаммов *S. meliloti* А1 и А2 из рабочей коллекции клубеньковых бактерий лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИСХМ, которые изначально были выделены из клубеньков дикорастущих растений-хозяев видов *Melilotus dentatus* и *Medicago lupulina*, соответственно, произрастающих в современном центре интрагрессивной гибридизации тетраплоидной люцерны на севере Казахстана (район предгорья Мугоджары), подверженном вторичному засолению [1, 2]. По результатам оценки симбиотической эффективности штаммов А1 и А2 в симбиозе с растениями *M. varia* сорта Вега 87 в условиях неоднократно повторённых микровегетационных опытов, они были охарактеризованы как высокоэффективные. Симбиотическую эффективность этих штаммов также оценивали в симбиозе с разными сортами люцерны изменчивой в деляночных опытах на сельскохозяйственных полях, расположенных в разных регионах РФ в рамках Географической сети опытов [3, 4]. Прибавки зелёной и сухой массы растений определяли в процентах (%) относительно контроля без инокуляции; достоверность различий между вариантами оценивали согласно значениям НСР. Прибавки, полученные в результате инокуляции семян люцерны сортов Пастбищная 88, Агния и Вега 87 штаммами А1 и А2, а также сортов Таисия и Лада – штаммом А2, в условиях агроценозов Центрального и Северо-Западного федеральных округов, были достоверно выше (на 14,7–145,4 %) прибавок, полученных после обработки семян растений этих же сортов производственными штаммами *S. meliloti* 425а и/или 415б, на основе которых изготавливают биопрепараты [3–5].

Нами выполнено полногеномное секвенирование штаммов А1 и А2 методами 2-го и 3-го поколения на геномном секвенаторе MiSeq (Illumina, США), дающем короткие точные прочтения и MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания), дающем длинные прочтения. Совместное использование результатов обоих методов позволило получить данные о структуре всех репликонов изучаемых штаммов.

Установлено, что геномы штаммов А1 и А2 имеют организацию, характерную для клубеньковых бактерий вида *S. meliloti* и включают три основных репликона: хромосому и две мегаплазмиды. Размер хромосомы и мегаплазмиды SMb в среднем меньше на 2 % у штамма А2, тогда как в случае штамма А1, наоборот, размер хромосомы на 4 % выше, а SMb – аналогичен таковому у референс-штамма Rm1021. Наиболее значительные изменения установлены в случае размеров симбиотической мегаплазмиды SMa: в случае штамма А2 размер SMa был на 9,6 % меньше, а штамма А1, наоборот, больше на 12 %, чем у Rm1021. Выявлены штаммоспецифичные однонуклеотидные замены в последовательностях хромосомных маркеров ITS и гена *betC*, а также *nod* генов, детерминирующих синтез видоспецифичной сигнальной молекулы Nod-фактора и локализованных на симбиотической мегаплазмиде, которые могут быть использованы для создания штаммоспецифичных маркеров для поиска хозяйственно-ценных штаммов-инокулянтов.

Особо стоит отметить, что, помимо основных репликонов, в геномах изучаемых штаммов выявлены криптические плазмиды: две у А1 (210 и 400 kb) и одна – у штамма А2 (350 kb). В настоящее время проводится функциональный анализ ОРС данных репликонов, поскольку такие плазмиды могут нести гены, влияющие на экологическую адаптивность, а также на симбиотические свойства штамма [6, 7], что делает их крайне интересными для анализа.

Таким образом, данные, которые получены на первом этапе геномного анализа двух высокоэффективных штаммов *S. meliloti*, показывают, что использование современных молекулярно-генетических подходов перспективно для поиска уникальных маркеров хозяйственно-ценных признаков клубеньковых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ибрагимова М.В. и др. // Микробиология. 2006. Т. 75 (1). С. 94–100.
2. Иванов А.И. Люцерна. М.: Колос, 1980:350 с.
3. Кожемяков А.П. и др. // Сельскохозяйственная биология, 2011. Т. 46 (3). С. 112–115.
4. Кожемяков А.П. и др. // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50 (3). С. 369–376. Doi: 10.15389/agrobio.2015.3.369rus
5. Степанова Г.В. // Мат-лы Междун. науч.-практ. конф. 2018. С. 247–254.
6. Румянцева М.Л. и др. // Экологическая генетика. 2009. Т. 7 (2). С. 19–25.
7. Lagares A. et al. // Microbiol Spectr, 2014. № 2 (5). Doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0005-2013.

Работа выполнена в рамках проекта ФЦП № 14.607.21.0178.

АНТИОКСИДАНТНАЯ, ДНК-ПРОТЕКТОРНАЯ И SOS-ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТОВ *Enterococcus durans*

**В.Н. Стаценко, М.П. Куликов, Е.В. Празднова, Е.Ю. Харченко,
Н.В. Коростылев, Т.В. Белик**

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: 1001011100m@gmail.com

Механизмы действия пробиотиков на клеточном и молекулярном уровнях до сих пор являются предметом обсуждения. Исследования показывают, что вещества, выделяемые пробиотическими бактериями, могут оказывать антиоксидантное, антимуtagenное и антигенотоксическое (ДНК-протекторное) действие [1, 2]. Кроме того, метаболиты некоторых штаммов способны выделять вещества, подавляющие SOS-ответ у других, патогенных или условно патогенных видов бактерий [3].

Целью нашего исследования было изучение биологической активности отдельных фракций метаболитов, выделяемых пробиотическими бактериями трёх штаммов *Enterococcus durans* (B6480, B6363 и B6379). Метаболиты каждого штамма были разделены на фракции методом ионообменной хроматографии на хроматографе «BioLogicLPsystem» (Bio-Rad Laboratories, США). Для всех фракций были изучены спектры поглощения на спектрофотометре Beckman Coulter. Затем проводился скрининг на биологическую активность с помощью биосенсорного теста. Изучалась возможность подавления метаболитами SOS-ответа у штамма *Escherichia coli* MG 1655 pRecA, ДНК-протекторная активность на этом же штамме и антиоксидантная активность на штамме *E. coli* MG 1655 pKat. ДНК-протекторная активность изучалась при использовании диоксида в качестве индуктора, подавление SOS-ответа изучалось при использовании ципрофлоксацина в качестве индуктора. Использовалась методика, подробно описанная в [2].

Было исследовано 15 фракций метаболитов, 6 фракций *Enterococcus durans* B6480, 5 фракций *Enterococcus durans* B6363 и 4 фракции *Enterococcus durans* B6379. В результате полученного исследования было установлено, что семь из изученных фракций обладают антиоксидантной

активностью, девять фракций обладают генопротекторной и антимуtagenной активностью (табл.). Фракции *Enterococcus durans* B6480 усиливали индукцию SOS-ответа ципрофлоксацином, четыре из шести – индукцию повреждения ДНК диоксицином, зато проявляли антиоксидантную активность. Фракции штамма *Enterococcus durans* B6363, напротив, вызывали усиление окислительного стресса, однако же проявляли высокую ДНК-протекторную и SOS-ингибирующую активность, причем статистически значимый эффект наблюдался во всех фракциях. Все фракции штамма *Enterococcus durans* B6379 имели генопротекторный эффект, наиболее выраженный во фракциях № 1 и № 3; фракция № 3 также имела выраженный антиоксидантный эффект.

Таблица

Скрининг протекторной активности фракций бактериальных метаболитов

Штамм	Фракция*	Диапазон поглощения, нм	ДНК-протекторная активность, %	АнтиSOS активность, %	Антиоксидантная активность, %
<i>Enterococcus durans</i> B6480	№1	210	17,1	индукция***	77,5
	№2	210	5,0	индукция	50,9
	№3	210	индукция	индукция	41,9
	№4	210-250	индукция	индукция	82,7
	№5	230-300	индукция	индукция	39,3
	№6	210	индукция	индукция	42,7
<i>Enterococcus durans</i> B6363	№1	210	98,8	74,9	индукция
	№2	210	98,6	65,5	индукция
	№3	210	58,6	68,9	индукция
	№4	210	94,9	80,7	индукция
	№5	210	93,5	99,1	индукция
<i>Enterococcus durans</i> B6379	№1	210-250	71,3	71,4	Нет эффекта**
	№2	210	26,0	39,4	Нет эффекта
	№3	210	16,9	85,1	94,8
	№4	210	4,9	84,3	Нет эффекта

Примечания: * – чем выше номер фракции, тем больше отрицательный заряд соединения, содержащегося в фракции; ** – нет статистически достоверного протекторного эффекта либо индукции; *** – наблюдалось усиление эффекта соответствующего индуктора.

Максимум поглощения большинства фракций данных штаммов составил 210 нанометров, что может свидетельствовать о том, что в их составе преобладают пептиды [4]. Поскольку предыдущие эксперименты с подобными штаммами [2] показали, что целевые метаболиты пробиотиков обладают термостабильностью и устойчивостью к протеазам, что характерно для коротких олигопептидов, можно предположить, что именно они являются медиаторами интересующей нас биологической активности.

Фракция № 1 штамма B6379 содержит метаболиты, которые, судя по диапазону поглощения 210-250 нм, включают цистеин или фенилаланин. Исходя из применённого нами метода хроматографии, пептиды данной фракции должны быть положительно заряжены, либо не иметь заряда, тогда как фракция № 3 содержит метаболиты, заряженные отрицательно.

На основании представленных данных можно заключить, что метаболиты пробиотических штаммов, обеспечивающие целевую активность, могут иметь пептидную природу и сильно варьируют от штамма к штамму. Из трех изученных штаммов штамм *Enterococcus durans* B6379 представляется наиболее перспективным в качестве пробиотика, т.к. обладает всеми тремя из изученных видов биологической активности, и не вызывает прооксидантного эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Старовойтова С.А., Орябинская Л.Б., Горчаков В.Ю., Дуган А.М. Антисканцерогенные свойства молочнокислых бактерий. Киев: Национальный технический университет Украины «КПИ», 2007.
2. Chistyakov V., Prazdnova E., Mazanko M., & Bren A. // Biosensors. 2018. Vol. 8 (1). P. 25.
3. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Churilov M.N. et al. // Letters in applied microbiology. 2015. Vol. 61 (6). P. 549–554.
4. Caughey G.H. et al. // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1988. Vol. 244. №. 1. P. 133–137.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект МК-5950.2018.4.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ *Hordeum sativum* при ЗАГРЯЗНЕНИИ МЕДЬЮ

**В.В. Степаненко, И.Н. Сазонов, Н.П. Черникова, Е.Д. Кулаева, Е.В. Бутенко,
С.С. Манджиева**

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: msaglara@mail.ru

Необходимость получения экологически чистой продукции в условиях хронического загрязнения обуславливает изучение влияния тяжёлых металлов (ТМ) на развитие сельскохозяйственных культур. Цитогенетические показатели растений оптимальны для выявления воздействия ТМ, так как мало подвержены влиянию внешних условий, но обладают высокой чувствительностью к действию широкого спектра техногенных поллютантов. Тяжелые металлы оказывают негативное влияние на клетки апикальных меристем, весьма чувствительных к различным видам стрессового воздействия. Медь как химический элемент широко распространена в тканях растений и является важным микроэлементом для их роста. Тем не менее, медь становится токсичной, когда её содержание превышает некий пороговый уровень, который зависит от вида растений.

Целью работы является изучение влияния ацетата меди на апикальную меристему ярового ячменя (*Hordeum sativum disticum*).

Для выполнения поставленных целей был заложен модельный эксперимент с чернозёмом обыкновенным мощным слабогумусированным тяжелосуглинистым на лесовидных суглинках. В качестве тест-культуры использован яровой ячмень двурядный сорта «Ратник» (*Hordeum sativum disticum*). Яровой ячмень – одна из самых распространённых культур, выращиваемых на юге России. Данные культуры широко используют в токсикологических исследованиях в качестве стандартного тест-объекта для определения токсичности поллютантов.

Для цитогенетического анализа апикальных меристем корня семени ячменя проращивали на влажной фильтровальной бумаге ($H_2O_{\text{дист}}$), на чистой почве и почве, загрязнённой водным раствором ацетата меди (в дозе 300 и 2000 мг/кг) в чашках Петри при 24 °С. Концентрация 300 мг/кг Си зафиксирована в почвах агроландшафтов Ростовской области, концентрация 2000 мг/кг металла встречаются в почвах техногенных ландшафтов. Корни длиной ≈ 10 мм обрабатывали фиксатором Кларка, окрашивали ацетоорсеином, и делали временные давленные препараты. При анализе определяли митотический индекс (МИ), частоту аберрантных клеток, спектр и частоту цитогенетических аномалий (мостов, отставаний, слипаний и нерасхождений хромосом, патологических анафаз).

Выявлено влияние внесения дозы 2000 мг/кг меди на генетические структуры клеток ячменя ярового. С использованием анафазного метода выявлены такие нарушения, как мосты, фрагменты, отставания хромосом и мультиполярные митозы. В исследованиях установлено интенсивное возрастание частоты возникновения хромосомных aberrации с увеличением концентрации ТМ.

Для ячменя выявлено повышение МИ на чистой почве по сравнению с дистиллированной водой (в 2,6 раза), затем снижение на дозе 300 мг/кг (в 1,1 раз), максимальное значение МИ наблюдалось

на дозе 2000 мг/кг (в 1,7 раз выше). МИ, хотя и высокие, но нельзя судить о том, что клеточный цикл протекает нормально, так как клетки задерживаются на стадии профазы из-за активации систем проверки целостности генетического материала и его репарации.

При повышении концентрации в корнеобитаемой среде ТМ интенсивность клеточных делений повышается в меристеме корня растений, но клетки останавливаются на стадии профазы, а также уменьшаются их размеры. Установлено изменение количества клеток на всех фазах митоза ячменя ярового при разном уровне загрязнения почвы медью (рис.).

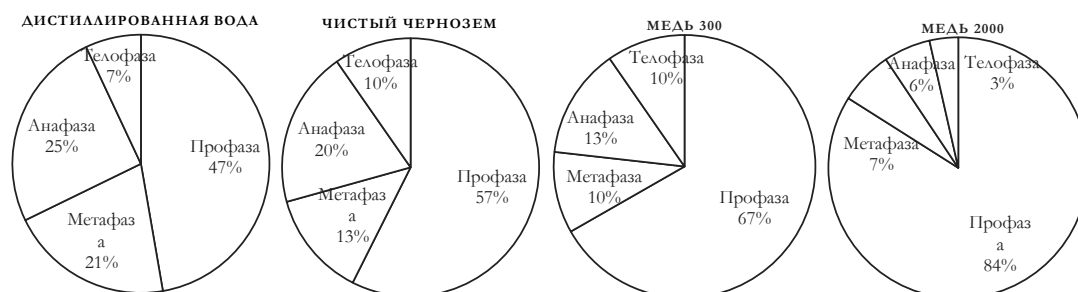


Рис. Процент клеток ячменя ярового в различных фазах митоза при загрязнении почвы медью

Таким образом, установлено, что при загрязнении почвы ацетатом меди нарушается процесс нормального митотического деления клеток корневой системы растения, что проявляется в изменении соотношения фаз клеточного цикла и увеличении частоты хромосомных aberrаций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-55-05023 и № 19-29-05265мк) и гранта Президента (№ МК-2818.2019.5). Исследования выполнены на оборудовании ЦКП Южного федерального университета «Высокие технологии», «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг».

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРАНСФОРМАЦИЮ УГЛЕВОДОРОДНЫХ СУБСТРАТОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

Д.Е. Хмелевцова, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: lehmelevcova@sfedu.ru; issa@sfedu.ru; samara@sfedu.ru*

Микробная биотрансформация углеводов (УВ) нефти является ключевым звеном биоремедиационных процессов, используемых при очистке загрязнённых территорий. Показано, что микробиологическая деградация углеводов может сопровождаться образованием активных форм кислорода (АФК). Это происходит при окислении неподходящих субстратов ферментами с нестройкой субстратной специфичностью, которыми являются многие оксигеназы УВ. С одной стороны, токсическое действие АФК вызывает гибель части бактерий, но с другой стороны, АФК могут неспецифически окислять УВ и ксенобиотики, для которых нет ферментативных систем, повышая их биодоступность. В связи с этим целью работы было изучение окислительного стресса, вызываемого присутствием УВ, на микроорганизмы-деструкторы. Была оценена генерация АФК (супероксид-анион-радикала и пероксида водорода), а также изменение активности антиоксидантных ферментов (супероксид-

дисмутазы и каталазы) УВ-окисляющими микроорганизмами в ходе инкубации их с различными УВ в качестве единственного источника углерода и энергии.

Были использованы штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенные на месте аварии танкера в Керченском проливе в 2007 г. и поддерживаемые в музее лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов ЮФУ. Генерацию супероксид-анион-радикала определяли методом люцигенин-активированной хемилюминесценции при инкубации микроорганизмов с пентаном, деканом, гексадеканом, циклогексаном, бензолом, нафталином, антраценом («Акватест», Россия), а также коммерческим дизельным топливом «Евро С». Накопление пероксида водорода определяли методом люминол-активированной хемилюминесценции при инкубации микроорганизмов с теми же углеводородами в течение 30 дней. Уровень хемилюминесценции считали пропорциональным уровню накопления пероксида. Активность ферментов СОД и каталазы рассчитывали на 1 мг общего микробного белка на момент окончания инкубации. Активность СОД определяли по методу Sun с соавторами [1]. Активность каталазы определяли по методу Goth [2].

Изучение генерации супероксид-анион-радикала показало достоверное усиление хемилюминесценции в ответ на присутствие различных УВ у штаммов *Achromobacter xylosoxidans* №№ 4, 5, 7, а также штаммов *Acinetobacter calcoaceticus* №№ 6 и 13. Индукция хемилюминесценции варьировала от 1,5 раз относительно контроля у штамма *A. calcoaceticus* № 6 при инкубации с пентаном, до 13,9 раз у штамма *A. calcoaceticus* № 13 при инкубации с дизельным топливом. Было показано, что у всех изученных штаммов генерация и накопление пероксида водорода в разной степени усиливались только при инкубации с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии. Уровень хемилюминесценции, пропорциональный концентрации пероксида, колебался от 5,2-кратного превышения контрольных значений у штамма *A. calcoaceticus* № 13 до 178-кратного у штамма *A. xylosoxidans* № 5. Активность каталазы при культивировании всех штаммов в средах с УВ снизилась в 4,78–16,82 раза по сравнению со средой без УВ, тогда как уровень СОД, напротив, возрастал при культивировании с УВ – от 10,94-кратного у штамма *A. xylosoxidans* № 5 в присутствии гексадекана до 125-кратного у штамма *A. xylosoxidans* № 4 в присутствии пентана. Таким образом, биотрансформация углеводородных субстратов микроорганизмами сопровождается окислительным стрессом, выраженным в усилении генерации АФК и активации антиоксидантных ферментов (в частности, супероксид-дисмутазы), направленной на их детоксификацию. При этом в среде культивирования накапливается пероксид водорода, а активность бактериальной каталазы уменьшается. По-видимому, образующиеся АФК способны участвовать в начальном, неспецифическом окислении углеводов. Кроме того, окислительный стресс индуцирует SOS-ответ в клетке, в результате чего повышается частота мутаций. Это может привести к появлению изменённых форм ферментов деградации УВ [3], способных к утилизации новых углеводородных субстратов и дать возможность микроорганизмам осваивать новые экологические ниши.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sun Y., Oberley L.W., Li Y. // Clin. Chem. 1988. Vol. 34/3. P. 497–500.
2. Goth L. // Clin. Chim. Acta. 1991. Vol. 196. P. 143–151.
3. Pérez-Pantoja D., Nikel P.I., Chavarría M., de Lorenzo V. // PLoS Genet. 2013. Vol. 9 (8). P. e1003764. Doi:10.1371/journal.pgen.1003764

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (грант №6.2379.2017/ПЧ) и РФФИ (грант 17-04-00787 А).

hsd*-ГЕНЫ КАК МАРКЕРЫ-ПОИСКА ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ШТАММОВ *Sinorhizobium meliloti

М.Е. Черкасова, А.С. Саксаганская, В.С. Мунтян, М.Л. Румянцева

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, 19660, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пушкин-8, 8 ш. Подбельского, 3
E-mail: mariiacherkasova@mail.ru; mroumiantseva@yandex.ru

Поиск генетически стабильных хозяйственно-ценных штаммов *Sinorhizobium meliloti*, перспективных для биопрепаратов, по совокупности всех необходимых вегетационных, биохимических и технологических тестов может занимать более десяти лет [1–3]. В связи с этим поиск молекулярно-генетических маркеров, позволяющих упростить и ускорить данный процесс, является крайне актуальной задачей.

Показано, что штаммы *Sinorhizobium meliloti*, имеющие в структуре генома *hsd*-гены, кодирующие белки системы рестрикции-модификации (СРМ) I типа, являются генетически более стабильными [4]. У прокариот выявлено три типа СРМ и основная их функция – в защите клетки от чужеродной ДНК [5]. В геноме референс штамма *S. meliloti* Rm1021 выявлен блок из трёх *hsd*-генов: *hsdR*, *hsdS* и [4], продуктами которых являются белки: эндонуклеаза R, сайт-специфический белок S и метилаза M, соответственно. Блок *hsd*-генов, фланкирован с одной стороны полноразмерными IS-элементами (ISRm1 и ISRm2011–2), а с другой – интегразой фаговой природы, что позволяет отнести его к потенциально мобильным элементам генома [6].

Представляло интерес оценить встречаемость *hsdR*, *hsdS* и *hsdM* генов у природных изолятов *S. meliloti* и у высокоэффективных штаммов, перспективных для практики. Детекцию *hsd*-генов проводили методом ПЦР с использованием пар праймеров, сконструированных на основании последовательности генома Rm1021 (RefSeq: NC_003047.1). Для исследования было случайным образом отобрано по 37 и 48 штаммов *S. meliloti* из коллекции природных штаммов клубеньковых бактерий лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИСХМ, выделенных в Переднеазиатском и Среднеазиатском генцентрах бобовых культур, соответственно [7]. В группу высокоэффективных штаммов были отобраны 15 коллекционных штаммов, в симбиозе с которыми была показана прибавка сухой массы растений люцерны больше 40 % относительно инокуляции эффективным штаммом Rm1021 в условиях стерильного микровегетационного опыта [8], а также 14 производственных штаммов, полученные из лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий ФГБНУ ВНИИСХМ.

Был проведён анализ частот встречаемости *hsdR*, *hsdS* и *hsdM* генов и различных сочетаний указанных генов (два из трёх или три гена) в изучаемых репрезентативных группах природных штаммов *S. meliloti* из разных генцентров. Показано, что группы природных штаммов достоверно не различались ($X^2 = 8,6$, $p = 0,28$, $df = 7$), что позволило объединить обе выборки для дальнейшего анализа. Установлено, что частота встречаемости *hsd* генов у природных штаммов не превышала 0,21; три *hsd*-гена (как у референс штамма *S. meliloti* Rm1021) встречалось с частотой 0,01. В группе высокоэффективных штаммов *hsd* гены встречались более чем в 1,5 раза чаще (0,36), чем у природных, при этом частота встречаемости трёх *hsdRSM* была в 14 раз выше, чем у природных штаммов (частота 0,14). По частотам встречаемости *hsd*-генов выборки природных штаммов и высокоэффективных штаммов достоверно различались ($X^2 = 18,6$, $p = 3,2 \cdot 10^{-2}$, $df = 7$).

Таким образом, в геномах высокоэффективных штаммов, перспективных для биопрепаратов, достоверно чаще, чем у природных изолятов, встречались все три *hsd*-гена. Сделан вывод, что анализ наличия этих генов может быть рекомендован для создания на их основе маркерных последовательностей для экспресс-выявления высокоэффективных штаммов *S. meliloti*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Deaker R. et al. // Soil Biology and Biochemistry. 2004. Vol. 36 (8). P. 1275–1288. Doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009.

2. *Vriezen J.A. et al.* // Applied and Environmental Microbiology. 2007. Vol. 73 (11). P. 3451–3459. Doi: 10.1128/AEM.02991-06.
3. *Buntic A.V. et al.* Archives of Biological Sciences. 2019. Vol. 71 (2). P. 379–387. Doi: 10.2298/abs181008062b.
4. *Ferri L. et al.* // Plasmid. 2010. Vol. 63 (3). P. 128–135. Doi: 10.1016/j.plasmid.2010.01.001.
5. *Пиневиц А.В.* Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3 т. Т. 3. СПб: СПбГУ. 2009. 457 с.;
6. *Румянцева М.Л. и др.* // Генетика. 2018. Т. 54 (7). С. 745–756. Doi: 10.1134/S0016675818070135).
7. *Румянцева М.Л.* // Генетика. 2009. Т. 45 (9). С. 1157–1172.;
8. *Румянцева М.Л. и др.* Биологическое разнообразие клубеньковых бактерий в экосистемах и агроценозах. Теоретические основы и методы / Под ред. М.Л. Румянцевой, Б.В. СПб.: ВНИИСХМ, 2011. 104 с.

Работа выполнена при поддержке ФЦП 14.607.21.0178.

DETERMINING THE EFFECTS OF DROUGHT ON MAJOR PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN PLANTS

T.H. Tamrazov

Department of Plant Physiology and Biotechnology, Research Institute of Crop Husbandry, Azerbaijan Pirshagi, Sovkhoz-2, Baku AZ1098, Azerbaijan,

E-mail: tamraz.tamrazov@mail.ru

Drought stress during the grain filling period has recently become more common in Azerbaijan, where wheat (*Triticum aestivum* L., *Triticum durum* desf.) Is grown as an important crop of winter cereals. Wheat has physiological mechanisms that allow adaptation of drought stress and may vary between different genotypes. At present, the classification of useful areas by stress factors, natural stress factors, covers more than 26 % of drought. On the other hand, 20 % stress salinity and 15 % stress fever. On the other hand, 20 % stress salinity and 15 % stress fever. Other stresses make up 29 %. Only 10 % of the territory is not subject to stress.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important crops in world, which plays a special role in people's nutrition. Also, Wheat provides over 20 % of calories needed by the world's population.

Therefore, disadvantage climatic conditions are one of the most pressing climate problems, creating new varieties and plant samples that are highly productive and resistant to plant stress-resistant genotypes, including various droughts and salinity. The study of these mechanisms in plants is of great theoretical and practical importance for the creation of resistant plant varieties and samples for adverse environmental factors.

The purpose of this experiment was to study the effect of extreme stress from drought on grain yield, gas exchange parameters and some physiological features of bread and durum wheat varieties. In order to detect tolerance mechanisms in plants and increase the resistance of plants to stress factors, first of all, it is necessary to determine the physiological and genetic changes occurring in plants, and to investigate the effects of these changes in stress-resistant and sensitive plant genotypes. Conducting such studies can also help identify important genes that are resistant to stress factors in individual genotypes. The identification of stress-resistant gene sources and their use as a donor in practical selection are among the most important issues currently in the selection process. Therefore, disadvantage climatic conditions are one of the most pressing climate problems, creating new varieties and plant samples that are highly productive and resistant to plant stress-resistant genotypes, including various droughts and salinity.

It has been studied the dynamics of changing morphophysiological signs of the genotypes learned from drought, taking into account the characteristic, drought and disease duration as a result of various morphological and physiological studies on genotypes of 96 «wheat genotypes selected from the international breeding and local gene pool.

The experiments were carried out on wheat genotypes with contrasting maturation periods (early, medium and late) at the Absheron, Jalilabad Experimental Stations of the Research Institute of Crop Husbandry during 2018–2019 year vegetation years. Maturing duration is known to be the most important factor in the plant growth. Because of differences in climatic and soil conditions in the regions of our country, the study of this factor is needed. In this point of view, early and late maturing varieties should be preferred. In general, early maturing wheat genotypes are more characteristic of regions, where spring-summer drought onsets early. On the other hand, the main part of the genotypes are medium maturing that should be considered in the wheat cultivation in most regions.

Productivity indices of wheat genotypes

Genotypes	Absheron Experimental Base Station		Jalilabad	Gobustan Regional Experimental Station
	<i>Irrigated, g/m²</i>	<i>Drought, g/m²</i>	Regional Experimental Station	
Garagylchyg-2	617	457	515	400
Alinja-84	473	380	485	340
Nurlu-99	518	493	585	450
Gobustan	423	405	455	550

Grain yield of the same varieties were determined in various regions. As seen in the table 1 in the durum wheat genotype-Garagylchyg-2 grown in Absheron the highest productivity index was found to be 617 g/m² and 457 g/m² in watered and drought-exposed plants, respectively, with 25,9 % difference between the variants. In other durum wheat variety Alinja-84 this index was equal to 473 and 380 g/m² in watered and drought-exposed plants, respectively, and the difference between these values was 19,6 %. The same parameter was determined in the bread wheat varieties Nurlu-99 and Gobustan. The productivity index was found to be 518 and 493, respectively, for watered and drought-exposed plants of the Nurlu-99 variety. However, for the Gobustan variety 423 and 405 were found, respectively, for watered and drought-exposed plants. The difference between varieties was as follows: 4,8 % in Nurlu-99 and 4,3 % in Gobustan.

The results of the experiments performed in Gobustan were completely different. Because, contrary to previous regions, early maturing genotypes are not considered as characteristic for the Gobustan region. Generally, bread wheat varieties were more productive compared with durum wheat varieties. Thus, maximum productivity for Gobustan and Garagylchyg-2 was found to be 550 g/m² and 400 g/m², respectively. Maximal indices were also found for the durum wheat variety Garagylchyg-2 and the bread wheat variety Nurlu-99 as a result of the analysis of productivity of wheat varieties cultivated in the Jalilabad region. Thus, similar results were obtained almost for all the studied genotypes. Regarding to the tolerance, Garagylchyg-2 and Nurlu-99 were more tolerant as well.

It should be noted that the evaluation of the studied early maturing wheat genotypes was conducted based on their tolerance to diseases, height, productivity and architectonics.

To examine the accuracy of the obtained data, some indices were analyzed statistically. First of all, according to the structural analysis, the correlation between structural elements was established and regression model was constructed.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА ПРИ АДАПТАЦИИ НЕФРОНА К ДЛИТЕЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ МОЧЕТОЧНИКА

М.А. Акименко, Т.С. Колмакова, О.В. Воронова

Ростовский государственный медицинский университет, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29.

E-mail: akimenkoma@yandex.ru; tat_kolmakova@mail.ru; 9043401873@mail.ru

Последние десятилетия внедрение методов молекулярно-биологического исследования позволил по-новому взглянуть на пато- и морфогенез заболеваний почек. В качестве одного из важных путей прогрессив хронических заболеваний почек рассматривается эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), как отражение пластичности дифференцировки эпителия. ЭМП – это процесс, при котором эпителиальные клетки утрачивают присущие им морфофункциональные свойства (межклеточную адгезию и апикально-базальную полярность) и приобретают свойства мезенхимальных клеток

(веретеновидная форма, подвижность). Пластичность клеток эпителия обусловлена, главным образом, двумя процессами: метаплазией, или трансдифференциацией, и клеточной трансформацией. В обоих случаях происходит активация «запрещенных к экспрессии» генов локусов хромосом. Схема событий такова: при раздражении мембраны эпителиоцитов происходит нарастание стресс-волокон, «рекрутирование» молекулярных носителей ЭМП, синтез сократительных волокон, накопление в клетках лизосом, лизис подлежащей базальной мембраны с последующим формированием псевдоподий на мембране клеток и выходом в окружающую межтканевую ткань с началом функционирования данных клеток как фибробластов. Таким образом, для того, чтобы произошел ЭМП, необходима как смена локусов экспрессируемых генов, так и появление у эпителиоцитов маркеров (рецепторов), характерных, для мезенхимальных клеток или же фибробластов.

Ключевыми звеньями ЭМП являются: подавление экспрессии гена E-кадгерина, участвующего в образовании плотных контактов между эпителиоцитами, и увеличение экспрессии генов, ответственных за мезенхимальный фенотип эпителиоцитов, таких как виментин, гладкомышечный актин. Данные процессы являются основой развития фиброза и атрофии почек, т.е. формирования хронической болезни почек, вплоть до терминальной стадии хронической почечной недостаточности. В связи с этим актуальность приобретают исследования динамики изменений эпителия отделов нефрона при механической обструкции мочевыводящих путей.

Целью нашего исследования явилось изучение молекулярно-биологической маркеров изменения фенотипа эпителиальных клеток нефрона почки при длительной обструкции мочеточника на экспериментальной модели.

Эксперимент выполняли на базе отдела фундаментальной и клинической морфологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО РостГМУ. Исследования разрешены локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол №21/15 от 10.12.2015 года). Модель механической обструкции воспроизводилась на 24 взрослых кроликах (самцы в возрасте 3,5 месяцев, весом 2,4–2,75 кг), которые были разделены на четыре группы по шесть животных в каждой: одна контрольная и три экспериментальных, в зависимости от сроков механической обструкции (7, 14 и 21 сутки). Иммунофенотипирование образцов ткани почки, полученных в эксперименте, проводили на маркеры адаптационных изменений в структуре нефрона (эпителиального фенотипа (цитokerатины 7 (СК7) и AE1/AE3 (МСК), E-кадгерин), мезенхимального фенотипа (виментин (Vim), гладкомышечный актин (SMA)).

Начиная с седьмых суток эпителий собирательных трубочек перестает экспрессировать СК7 на всём своём протяжении, заметно снижается экспрессия МСК в эпителии дистальных извитых канальцев, обращает внимание и снижение экспрессии маркера E-кадгерина в мембранах дистальных извитых канальцев и собирательных трубочек. На фоне серьёзных гистологических изменений в ткани почки на 21-е сутки обструкции наблюдается точечная экспрессия E-кадгерина на апикальной мембране эпителиоцитов дистальных извитых канальцев, а также полная потеря экспрессии маркера клетками собирательных трубочек на всём их протяжении. Значительное увеличение доли стромального компонента с течением эксперимента повлекло усиление экспрессии Виментина в межтканевой соединительной ткани обструктивной почки. Гладкомышечный актин не меняет своей локализации, оставаясь высокоинтенсивным в миоцитах сосудов. При этом с увеличением срока обструкции в некоторых эпителиальных клетках дистальных извитых канальцев появляется слабое цитоплазматическое окрашивание данного мезенхимального маркера.

При длительной обструкции мочеточника первые признаки ЭМП как механизма молекулярно-биологической адаптации нефрона к повреждающим факторам проявляются к седьмым суткам. Необратимый характер перехода эпителиоцитов в клетки мезенхимы отмечается к 14-м суткам. Это подтверждается изменением фенотипа эпителиальных клеток: потерей эпителиальных маркеров (СК7, МСК, E-кадгерин) и приобретением мезенхимальных маркеров (Vim, SMA).

ВЛИЯНИЕ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Альхаддур Азиз

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E.mail: azizkhaddour5@gmail.com

Низкие концентрации активных форм кислорода (АФК) необходимы для протекания нормальных физиологических процессов, таких как экспрессия генов, рост клеток и защита от инфекции. АФК оказывают свое влияние посредством обратимого окисления активных сайтов в факторах транскрипции, таких как ядерный фактор-каппа В (NF-κB) и активатор-белок-1 (AP-1), что приводит к экспрессии генов и росту клеток. АФК также могут вызывать косвенную индукцию факторов транскрипции путём активации путей передачи сигнала. При повышении в клетке уровня АФК проявляются повреждающие эффекты свободных радикалов, которые включают повреждения ДНК, окисление липидов мембран, образование сшивок ДНК–белок и др. Одним из факторов, способных изменять уровень АФК в клетках человека, являются различные вещества растительного происхождения, которые попадают в организм, в том числе и в виде пищевых продуктов. Фитохимические вещества могут быть классифицированы как терпеноиды, полифенолы, сероорганические соединения, фитостеролы и алкалоиды.

Семена граната обладают сильными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами благодаря высокому содержанию гидролизуемых танинов и антоцианов. Экстракт чеснока может действовать как поглотитель супероксидных радикалов. Кроме того, он способствует усилению антиоксидантной защиты в клетках за счёт усиления активности клеточных антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

Целью данной работы было оценить влияние экстракта семян граната (*Punica granatum*), винограда (*Vitis vinifera*) и экстракта чеснока (*Allium sativum*) на уровень свободно-радикальных реакций в клетках человека.

В качестве материала для исследования использовали культуру лейкоцитов периферической крови человека. Лейкоциты культивировали в присутствии экстрактов граната (4 %, 9 или 19 %), чеснока (3, 7 или 8 %) или винограда (2, 4 или 6 %). Интенсивность свободно-радикальных реакций оценивали по уровню быстрой вспышки и светосуммы люминол-зависимой хемилюминесценции. По результатам исследования, показано, что экстракт граната и экстракт виноградных косточек значительно снижают интенсивность хемилюминесценции в клетках человека по сравнению с контролем. При этом минимальная концентрация экстракта виноградных косточек снижает уровень свободных радикалов на 50 %, а максимальная из использованных концентраций экстракта граната снижает количество АФК до 95 %. Напротив, экстракт чеснока значительно увеличивает интенсивность свободно-радикальных процессов по сравнению с контролем.

ОЦЕНКА ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ *Prunella grandiflora* L. И *Achillea millefolium* L. НА ПРИМЕРЕ *Drosophila melanogaster*

О.Н. Антосюк¹, Е.В. Болотник², В.Н. Орлова¹, А.С. Постовалова¹

¹*Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19*

²*Ботанический сад УрО РАН, 620144, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202а*
Email: antosuk-olga@mail.ru

В связи с повышенной частотой онкологических заболеваний ведётся активный поиск оптимально подходящих для лечения лекарственных препаратов. В терапии используются такие противораковые препараты, как метотрексат, циклофосфамид, этопозид и т.д. Часто совместно с цитостатиками используется протектор для снижения общего токсического действия препарата. В качестве протекторов применяются различного рода БАВ, а также экстракты лекарственных растений. Для достижения оптимального протекторного эффекта экстракта необходимо, чтобы он сам по себе не вызывал негативных воздействий: токсического и генотоксического. В работе тестировали экстракты двух лекарственных растений, а именно 1 % *Prunella grandiflora* L., а также 0,5 и 5% *Achillea millefolium* L.

Для определения отсутствия токсического эффекта использовали метод определения ЛД и оценивали параметры жизнеспособности, включая плодовитость и летальность потомства на ранних и поздних этапах эмбрионального развития (РЭЛ, ПЭЛ). Для определения генотоксического эффекта применяли SMART-линии yellow и white singled. По результатам теста летальность в выборке с применением экстракта *P. grandiflora* L. сравнима с результатами в контрольной выборке, следовательно, токсического эффекта экстракты не вызывают. А при совместном применении с цитостатиками, например этопозидом, демонстрируются протекторные свойства экстракта *Prunella grandiflora* L. (рис.).



Рис. Частота летальности особей линии Oregon-R *D. melanogaster*, выращенных на питательных средах с экстрактом *P. grandiflora* L., этопозидом, как по отдельности, так и совместно

Также использование обоих видов экстрактов увеличивает плодовитость особей линии Oregon-R. Используя SMART, не выявили наличие эффекта, влияющего на изменение частоты рекомбинаций и мутаций при применении экстрактов обоих видов лекарственных растений.

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ADA В ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОШЕК

**М.Ю. Вакуленко^{1,2}, Е.В. Бутенко¹, Н.И. Акинина³, В.Н. Демидов², В.Ф. Пономарева²
В.Ф. Пономарева**

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Ростовский государственный медицинский университет, кафедра биохимии № 2, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский 29

В онкологии человека для классификации пациентов, больных раком молочной железы и для прогноза течения заболевания в течение многих лет использовали такие параметры, как возраст пациентов, состояние лимфатических узлов, размер опухоли, гистологические особенности, статус гормонального рецептора. Эти факторы чаще всего рассматриваются в комбинации для определения пациентов в различные категории риска. Хотя эти категории риска полезны для прогноза реакции на терапию рака молочной железы, их роль в определении прогноза и оценке риска у отдельного пациента более ограничена. Следовательно, для оценки прогноза и определения наиболее подходящего лечения для пациентов на индивидуальной основе необходимы более эффективные методы. В последнее время различные молекулярные методы, например определение экспрессии генов, всё чаще используется для уточнения классификации рака молочной железы и оценки прогноза течения заболевания и ответа на терапию [1]. Проект расшифровки генома домашней кошки открыл пути для молекулярных исследований на этих животных (*Felis catus*). Опубликованные протоколы Q-PCR рекомендуют использование эталонных генов. Оптимальное количество эталонных генов сильно различается между сердцем, почкой, печенью, лёгким, молочной железой и зубами, но возможно достаточно одного, двух референсных генов для применения на практике. Исследования по валидации кошачьих референсных генов руководствовались референсными генами, описанными у собак [2].

В нашей работе мы исследовали активность гена *ADA* в тканях опухолей молочной железы у кошек. Ген *ADA* кодирует аденозиндезаминазу – ключевой фермент пуринового обмена, снижение активности которого является критическим для процессов биосинтеза нуклеиновых кислот и клеточной пролиферации [3]. Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции из ткани опухолей проводили с помощью реагентов Евроген на базе лаборатории генетики академии биологии и биотехнологии ЮФУ. Синтез праймеров осуществлён фирмой Евроген. Последовательность использованных праймеров приведена в таблице 1.

Таблица 1

Последовательность праймеров для проведения ПЦР в режиме реального времени

Название	Последовательность 5'-3'
<i>B2M</i> forward	TTTGTGGTCTTGGTCCTGCTCG
<i>B2M</i> reverse	TTCTCTGCTGGGTGACGGGA
<i>GAPDH</i> forward	AGTATGATTCCACCCACGGCA
<i>GAPDH</i> reverse	GATCTCGCTCCTGGAAGATGGT
<i>ADA</i> forward	TTCGACAAGCCCAAAGTGGAG
<i>ADA</i> reverse	AACGCACCTCCACATACACC
<i>ERBB2</i> forward	CCCCTGTTCTCCGATGTGTG
<i>ERBB2</i> reverse	AGGTAGTTGTAGGGACAGGCA
<i>AKT1</i> forward	TTCATCGGCTACAAGGAGCG
<i>AKT1</i> reverse	CAAACCTCGTTCATGGTCACGC

Образцы кДНК нормировали по контрольному гену *B2M*, являющемуся «геном домашнего хозяйства», так как *B2M* экспрессируется практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне на всех стадиях жизненного цикла организма. Кроме того, в предварительных экспериментах установлено, что разброс уровней транскрипции для гена «домашнего хозяйства» *B2M* наименьший по сравнению с другим контрольным геном – *GAPDH*. Статистический анализ данных по уровню экспрессии генов проводили методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Данный метод показывает кратность изменений уровня экспрессии гена в сравниваемых образцах. $\Delta\Delta Ct$ и ΔCt рассчитывали согласно Livak и Schmittgen. Все значения экспрессии генов (ΔCt) в группах образцов сравнивали между собой как две выборки. Для подтверждения статистически значимых отличий между выборками образцов применяли

критерий Манна-Уитни. Для определения взаимосвязи изучаемых показателей при их нормальном распределении в совокупности использовали линейную корреляцию Пирсона (r). Результаты исследования представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Показатели ΔC_t для гена *ADA* в группах опухолей инвазивной неспецифической карциномы и фиброаденоматозной гиперплазии и контрольной группе

Контрольная группа <i>n</i> =10	Инвазивная неспецифическая карцинома <i>n</i> =4	Фиброэпителиальная гиперплазия <i>n</i> =4
0,4±0,07	5,57±0,31	7,44±0,59

Таблица 3

Показатели уровня экспрессии гена *ADA* в тканях опухолей инвазивной неспецифической карциномы и фиброэпителиальной гиперплазии к контрольной группе

Исследуемые группы <i>ADA</i>	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	U-критерий Манна-Уитни (<i>p</i>)
Инвазивная неспецифическая карцинома	5,17	36	<0,001
Фиброэпителиальная гиперплазия	7,04	131	<0,001

По данным литературы, аденозиндезаминаза осуществляет гидролитическое дезаминирование аденозина до иозина, и в быстро пролиферирующих тканях, например в лимфоцитах и клетках кишечника, активность данного фермента обычно возрастает [4]. Перерождение здоровых клеток молочной железы в опухолевые всегда сопровождается неконтролируемым ростом ткани. Соответственно, экспрессия гена *ADA* должна увеличиваться. Для подтверждения правильности сделанных выводов было проведено попарное сравнение средних показателей ΔC_t исследуемых микроРНК контрольной группы с группами инвазивной неспецифической карциномы и фиброэпителиальной гиперплазии с помощью U-критерия Манна-Уитни, данные которого также приведены в таблицах. Получены сходные результаты, которые подтверждают, что ткани опухолей инвазивной неспецифической карциномы и ткани фиброэпителиальной гиперплазии статистически значимо отличаются от контрольной группы по уровню экспрессии гена *ADA* ($p < 0,001$). Его уровень в тканях опухолей инвазивной неспецифической карциномы и в тканях фиброэпителиальной гиперплазии значительно повышен по сравнению с тканью здоровой молочной железы. Результаты проведенного исследования, подтверждают участие гена *ADA* в патогенезе онкологических заболеваний, а именно, в процессе неконтролируемого клеточного роста. Учитывая выше сказанное, выявление изменения количества определённых РНК, может быть использовано для понимания как патофизиологических основ развития канцерогенеза, так и для поиска молекулярно-генетических подходов к его ранней диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Francine B. De Abreu W., Wells A., Tsongalis G.J. // The American Journal of Pathology. 2015. Vol. 183, Issue 4. P.1075–1083.
2. Penning L.C., Vrieling H.E., Brinkhof B. // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2007. Vol. 120. P. 212–222.
3. Hameed A.K.M., El-Said T.O., Askar H.Y., Kady B.A.E. // The Egyptian Rheumatologist. 2019. Vol. 41, Issue 2. P. 81–85. Doi.org/10.1016/j.ejr.2018.05.005
4. Abbed K.M. Hameed Tamer O.El-Said, Hamdia Y. Askar // The Egyptian Rheumatologist. 2018. Vol.41, Issue 2. P. 81–85. doi.org/10.1016/j.ejr.2018.05.005

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРЫ-ПРЕДШЕСТВЕННИКА И СОРТА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ *F. fusarium*

Н.Г. Васильченко, А.В. Горовцов, М.С. Мазанко, Л.Е. Кухаренко, В.А. Чистяков

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
Ростовская управляющая компания, 344022, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону
E-mail: nvasilchenko@srfedu.ru

В связи с ростом потребности населения в качественных и безопасных продуктах сельского хозяйства возникает необходимость в выработке грамотных подходов и стратегий возделывания сельскохозяйственных культур.

Одной из главных культур, возделываемых на территории России и, в частности, в ЮФО является озимая пшеница. Поэтому широкую распространённость приобрел фузариоз колоса этой культуры. Возбудителями данного заболевания являются грибы рода *Fusarium*.

Традиционным подходом к решению проблем, связанных с распространением фитопатогенов является внедрение севооборота, см., например, работу [1]. Хотя авторы данного исследования указывают на снижение заболеваемости, однако очевидно, что также необходимым является поиск методов по борьбе с уже заражёнными растениями или обработка заражённых пожнивных остатков. На практике наиболее часто для этого используются фунгициды. Недостатком данного подхода является снижение эффективности химических средств защиты из-за выработки устойчивости к ним [2, 3].

В настоящее время в агротехнологической практике стали активно применять биологические средства защиты, основанные на использовании различных микроорганизмов.

Одной из перспективных групп микроорганизмов, отличающихся как способностью эффективно противостоять фитопатогенам, так и проявлять фитостимулирующие свойства, являются почвенные бактерии порядка *Bacillales* [4].

Цель исследования – оценить влияние культуры-предшественника и выращиваемого сорта пшеницы на выраженность антагонистических свойств у представителей ризосферных бактерий по отношению к грибам рода *Fusarium*.

Штаммы бактерий-антагонистов были получены путём совместного культивирования спорообразующих бактерий и грибов рода *Fusarium* на сусло-агаре.

На поверхность питательной среды газоном засеивалась культура *Fusarium graminearum*. Поверх культуры гриба засеивали пастеризованную суспензию ризосферной почвы в разведении 10^{-3} , затем инкубировали трое суток при температуре 25 °С.

Отбор производился по принципу наличия/отсутствия антагонизма. Отбирались все бактерии, демонстрировавшие зону подавления роста гриба вокруг своих колоний.

В результате было выделено 1040 штаммов спорообразующих бактерий-антагонистов. В дальнейшем выделенные чистые культуры культивировали с *F. graminearum* для измерения степени антагонистической активности по диаметру зоны подавления роста.

Статистическая обработка данных проводилась в программной среде STATISTICA10.

Первоначальным этапом работы была оценка влияния культуры-предшественника (рис. 1). Из данных литературы известно о немаловажном влиянии культуры-предшественника на частоту возникновения корневых гнилей [5]. Это определяет уровень инфекционного фона и частоту контактов бактерий-антагонистов и фитопатогенных грибов.

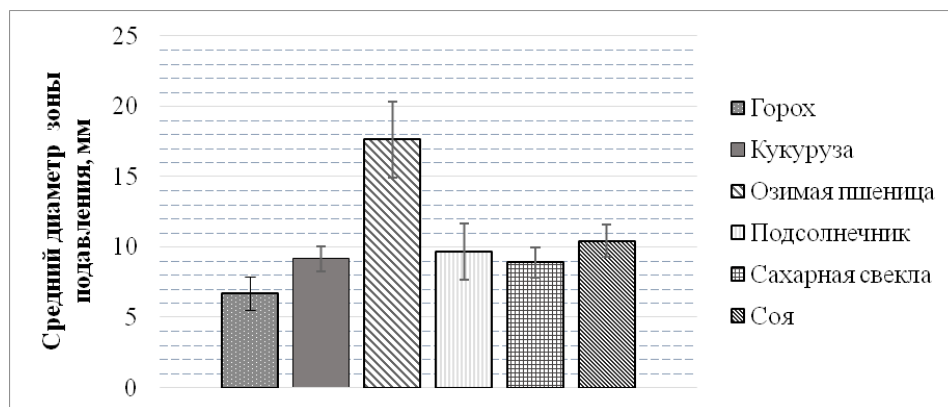


Рис. 1. Влияние культуры-предшественника на показатели антагонистической активности штаммов

Проанализировав данные графика, можно сделать вывод, что выраженность антагонизма была наиболее высокой при культивировании пшеницы по пшенице. Данная взаимосвязь обусловлена накоплением фитопатогенов в почве при отсутствии севооборота, что создаёт предпосылки для отбора штаммов с более выраженными антагонистическими свойствами. При этом инфекционная нагрузка на агроценоз возрастает и увеличивается вероятность повторного заражения зерновых культур.

Также в ходе нашей работы было выявлено, что на степень антагонистической активности бактерий ризосферы влияет сорт озимой пшеницы, который выращивался на поле в момент отбора почвенных проб (рис. 2).

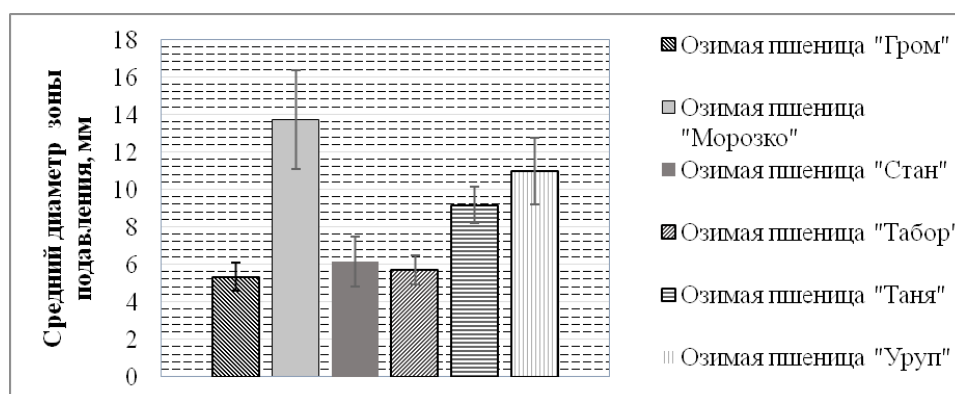


Рис. 2. Влияние сорта озимой пшеницы на показатели антагонистической активности штаммов

Исходя из данных, представленных на графике, можно видеть, что наиболее чувствительны к воздействию грибов рода *Fusarium* следующие сорта озимой пшеницы: «Морозко», «Уруп» и «Таня». Такой вывод был сделан на основании предположения, что высокая активность бактерий-антагонистов связана с конкуренцией с фитопатогенными грибами в ризосфере. Устойчивые сорта пшеницы менее активно поражаются фитопатогенами и в их прикорневой зоне не создается предпосылок для селективного отбора высоко активных штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tillmann M., von Tiedemann A., Winter M. // Journal of Plant Diseases and Protection. 2017. Vol. 124, № 2. P. 121–130.
2. Чекмарев В.В., Кобыльская Г.В., Бучнева Г.Н., Корабельская О.И. // Защита и карантин растений. 2011. № 3
3. Becker R., Hettwer U., Karlovsky P. et al. // Phytopath. 2010. № 100. P. 444–453
4. Chen F., Wang M., Zheng Y. et al. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010. Vol. 26 (4). P. 675–684.
5. Bainard L.D. et al. // Agriculture, ecosystems & environment. 2017. Vol. 240. P. 206–214.

РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫМ АНТИОКСИДАНТОМ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

**В.В. Внуков¹, О.И. Гуценко¹, С.Б. Панина¹, И.В. Корниенко², А.А. Ананян¹,
А.А. Плотников¹, Н.П. Милютин¹**

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Чехова, 41
E-mail: natmilut@rambler.ru

Известно, что окислительный стресс вызывает различные формы гибели клеток, в том числе, апоптоз, который является важнейшей причиной потери нейронов при нейродегенеративных расстройствах, ишемии и травматических повреждениях головного мозга. К распространённым моделям окислительного стресса относится гипербарооксигенация (ГБО), посредством которой исследуются механизмы нарушения свободнорадикального гомеостаза и запрограммированной гибели клеток в различных тканях организма. Установлено, что окислительный стресс, развивающийся при гипероксии, индуцирует митохондриальный и рецепторный пути апоптоза, что рассматривают как важнейший механизм повреждающего действия ГБО.

Цель работы – исследование влияния митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 – катионного производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенил-фосфония – на уровень экспрессии гена *CASP3*, активность каспазы-3 и уровень апоптоза в коре больших полушарий мозга и лимфоцитах крови крыс при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО).

Эксперименты проводили на беспородных крысах – самцах *Rattus norvegicus* массой 180–200 г. Все подопытные животные были разделены на четыре группы: 1-я – контроль – интактные животные; 2-я – крысы, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, (группа «К+ SkQ1»); 3-я – животные, подвергнутые действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после ГБО (группа «ГБО»). После 3-минутной вентиляции чистым кислородом в барокамере создавалось давление 0,5 МПа. Компрессию и декомпрессию проводили со скоростью 0,2 МПа/мин, изопрессия составляла 90 мин. Данный режим ГБО (0,5 МПа 90 мин) вызывает острый окислительный стресс. Четвертую группу составили животные, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, а затем через 1 ч после последнего введения подвергали действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после сеанса ГБО – группа («SkQ1 + ГБО»). Препарат вводили в рассчитанной дозе, растворённой в 100 мкл 0,2 %-ного раствора этанола в защётные мешки животных.

Установлено, что в физиологических условиях применение SkQ1 не приводит к изменению экспрессии гена *CASP3* в клетках коры больших полушарий мозга и лимфоцитах периферической крови крыс, активность каспазы-3 в мозге остаётся в пределах нормы, не изменяется количество апоптотических лимфоцитов.

При окислительном стрессе, вызванном ГБО (0,5 МПа, 90 мин, через 12 ч после действия) в клетках коры больших полушарий мозга содержание мРНК *CASP3* увеличивается на 57 %, в лимфоцитах крови – на 42 % по сравнению с нормой. Это может свидетельствовать о стимуляции экспрессии гена эффекторной каспазы-3, которая способна к расщеплению множества жизненно важных белковых субстратов клетки в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса. При этом в условиях ГБО найдено достоверное увеличение на 89 % активности каспазы-3 в коре полушарий мозга относительно контроля. Оценка интенсивности апоптоза лимфоцитов по регистрации фосфатидилсерина (ФС) во внешнем монослое мембран лимфоцитов с помощью FITC-меченого аннексина-V свидетельствует, что при ОС резко увеличивается количество клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза (+110 %).

Предварительное применение SkQ1, катионного производного пластохинона, в течение 5 дней перед действием гипероксии способствует сохранению уровня экспрессии гена *CASP3* в головном мозге и лимфоцитах и активности каспазы-3 в мозге, которые характерны для нормы. Применение SkQ1 приводит к нормализации количества апоптотических лимфоцитов в крови при ОС. Этот результат заслуживает особого внимания, вследствие того, что поддержание базального уровня активности каспаз в условиях окислительного стресса относится к перспективным стратегиям цитопротекции. Можно полагать, что одной из причин нормализующего влияния SkQ1 на экспрессию гена *CASP3* и активность фермента в мозге и уровень апоптотических лимфоцитов крыс при ГБО-индуцированном окислительном стрессе является активация транскрипционной активности гена *Nrf2* и *Nrf2*-контролируемых генов антиоксидантных ферментов [1, 2]. Это, с одной стороны, приводит к снижению уровня окислительного стресса, вызванного ГБО, и нормализации транскрипционной активности гена *CASP3*, который, как известно, активируется редокс-чувствительными факторами транскрипции. С другой стороны, повышение экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, регулируемых *Nrf2*, предотвращает формирование апоптосомы, где по механизму индуцированного сближения активируется каспаза-9, активирующая затем каспазу-3.

Таким образом, антиапоптотический эффект SkQ1 в ткани мозга и лимфоцитах крови при гипероксии связан с предотвращением повышения экспрессии гена *CASP3*, активности эффекторной каспазы в кортикальных отделах мозга и возрастания уровня апоптотических лимфоцитов в периферической крови. Протекторное действие SkQ1 при ГБО-индуцированном стрессе опосредуется разнообразным спектром антиоксидантных эффектов и стимуляцией антиапоптотических факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milyutina N.P. et al. // Biochemistry (Moscow). 2015. Vol. 80, № 12. P. 1861–1870.
2. Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milyutina N.P. et al. // Biochemistry (Moscow). 2017. Vol. 82, № 8. P. 942–952.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ, проект № 6.6762.2017/БЧ.

ВЛИЯНИЕ ГИДРОТЕРМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА УРОЖАЙНОСТЬ КУКУРУЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ АГРОКЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОНАХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

В.Н. Гудко, А.В. Усатов, Ю.В. Денисенко

Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: Gudko.1985@mail.ru, Usatova@mail.ru, Denik@list.ru

Ростовская область имеет значительную протяжённость как с севера на юг (470 км), так и с востока на запад (455 км). В связи с этим климатические факторы региона крайне неоднородны. Климатические условия региона оказывают существенное влияние на урожайность сельскохозяйственных культур [1]. В Ростовской области значительную часть посевных площадей отводят на возделывание кукурузы. Посевные площади кукурузы в регионе составляют около 188 тыс. га., и по данному показателю Ростовская область находится на третьем месте по стране.

Целью работы является анализ влияния температурного режима и количества осадков, на урожайность кукурузы в различных агроклиматических зонах Ростовской области.

Материалом исследования служили сорта и гибриды кукурузы (2 884 генотипов) отечественной и зарубежной селекции, проходивших конкурсное испытание в 2011–2018 гг. на сортоиспытательных участках филиала ФГБУ «Госсорткомиссия» по Ростовской области, расположенных в различных агроклиматических зонах Ростовской области: Восточная зона (Зимовниковский ГСУ), Приазовская

зона (Ростовский ГСУ) и Южная зона (Целинский ГСУ). Следует отметить, что в указанных трёх зонах сосредоточены основные посевные площади кукурузы в Ростовской области.

В качестве характеристики гидротермических условий территории использовали показатель ГТК (гидротермический коэффициент Селянинова). ГТК рассчитывается за весь период вегетации растений и равен отношению суммы осадков за период с $t > 10^{\circ}\text{C}$ к испаряемости. Величину испаряемости условно выражают суммой температур воздуха за период с $t > 10^{\circ}\text{C}$, уменьшенной в десять раз [2]. Период вегетации кукурузы на трёх указанных ГСУ составил около четырёх месяцев (май–август). Климатические данные для расчета ГТК нами были взяты из справочно-информационного портала «Погода и климат» (www.pogodaiklimat.ru). В качестве статистической оценки взаимосвязи между урожайностью и ГТК использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Значение ГТК вегетационного периода кукурузы (май–август) в период с 2011 по 2018 годы колебался в зависимости от агроклиматической зоны. Так, в Восточной зоне минимальное значение ГТК составило 0,28, максимальное значение 0,82, при среднем значении 0,56. В Южной зоне минимальное значение ГТК составило 0,45, максимальное – 0,89, при среднем значении 0,58. В Приазовской зоне минимальное значение ГТК составило 0,56, максимальное 1,14, при среднем значении 0,79.

Урожайность кукурузы в Восточной зоне (Зимовниковский ГСУ) варьировала от минимального значения 5,9 до 28,6 ц/га, при среднем значении 16,1 ц/га. В Приазовской зоне (Ростовский ГСУ) минимальное значение урожайности составило 20,3 ц/Га, максимальное 74,3, при среднем за период 48,6 ц/га. В Южной зоне (Целинский ГСУ) урожайность варьировала от минимальной 45,2 и до максимальной 77,5 ц/га, при среднем значении 61,7 ц/га. Результаты статистической обработки данных ГТК и урожайности отображены в таблице .

Таблица

Величина коэффициента корреляции по Спирмену между ГТК вегетационного периода и урожайностью кукурузы в период 2011–2018 гг.

Агроклиматическая зона Госсортучасток	Коэффициент корреляции по Спирмену (r)	p-value
Восточная зона Зимовниковский ГСУ	0,821	0,0341
Приазовская зона Ростовский ГСУ	0,821	0,0341
Южная зона Целинский ГСУ	1,000	0,0027

Согласно полученным в результате статистической обработки данным, ГТК и урожайность имеют высокую степень корреляции – $0,7 < r < 1$ при уровне значимости $p\text{-value} < 0,05$. За исследуемый период при возрастании ГТК территории величина урожайности также увеличивается по всем трём агроклиматическим зонам. Так, в среднем максимальные значения урожайности по всем зонам отмечались при значении ГТК $> 0,75$, минимальные значения отмечались при значении ГТК $< 0,45$. Размах значений ГТК для Восточной, Южной и Приазовской составил 0,54, 0,33 и 0,56 соответственно. Размах величины урожайности для Восточной, Приазовской и Южной зон составил 22,7 ц/га, 54 и 32,3 ц/га, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усатов А. В., Устенко А.А., Трехсвояков С.Н., Денисенко Ю.В. // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2011. №. 1. С. 146–147.
2. Селянинов Г.Т. // Мировой агроклиматический справочник. Л.; М.: Гидрометеиздат, 1937. С. 5–27.

СЕЛЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ – НОВЫЙ КЛАСС ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ИНСУЛЬТА

С.В. Демьяненко, В.А. Дзряян, В.В. Никул, А.Б. Узденский

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: demyanenkosvetlana@gmail.com; auzd@yandex.ru

Терапия инсульта была и остаётся одной из главных проблем здравоохранения. Ежегодно острые нарушения мозгового кровообращения являются причиной смерти около 5 млн человек и столько же становятся инвалидами. Ишемическое повреждение мозга характеризуется сложным и многоуровневым каскадом изменений сигнальных и эпигенетических путей внутриклеточной регуляции [1]. Активность деацетилаз гистонов (HDAC) и гистонацетилтрансфераз (HAT) определяет степень ацетилирования белков и доступность генов для транскрипции. Общей тенденцией при ишемии является снижение уровня ацетилирования гистонов, что может быть результатом ингибирования HAT и/или активации HDAC. В ряде работ показано защитное действие некоторых неселективных ингибиторов HDAC на моделях инсульта и нейродегенерации у животных. Однако недавние исследования свидетельствуют о том, что одни изоформы HDAC способствуют гибели клеток мозга, тогда как другие обладают защитным эффектом. Вероятно, поэтому введение неселективных ингибиторов HDAC сопровождалось токсическим эффектом.

Нами были проведены исследования баланса и внутриклеточной локализации HDAC в нейронах и астроцитах пенумбры фототромботического инсульта (ФТИ) у крыс и мышей в острый (до 24 ч) и восстановительный (3–21-й день) периоды после инсульта [2, 3]. Полученные данные позволили выделить несколько изоформ HDAC, ингибирование которых может иметь нейропротекторный эффект. Мы исследовали эффективность селективных ингибиторов HDAC2, HDAC3 и HDAC6. Проводили оценку объёма повреждения коры мозга, уровня апоптоза, функционального дефицита (тест «Цилиндр»), а также экспрессии маркера роста аксонов белка GAP43 в восстановительный период после ФТИ у мышей. Введение ингибитора HDAC3 BRD3308 в течение пяти суток после ФТИ приводило к росту апоптотически изменённых клеток в пенумбре и объёма инфаркта. Иммунофлуоресцентный анализ показал повышение экспрессии проапоптотического фактора транскрипции E2F1, что, в свою очередь, вызывало активацию каспазы-3 в нейронах, но не астроцитах коры мозга мышей (рис.). Избирательное ингибирование HDAC2 с помощью MI192 и HDAC6 тубастатином А (TubA) снижало объём повреждения и апоптоз клеток пенумбры, стимулировало рост новых аксонов, о чем свидетельствовало повышение уровня GAP43 [4]. Это способствовало более раннему восстановлению повреждённой сенсомоторной коры мышей и их двигательных функций после инсульта.



Рис. Эффект селективных ингибиторов HDAC2 MI192, HDAC6 Тубастатина А и HDAC3 BRD3308 при фототромботическом инсульте

Таким образом, ингибиторы HDAC являются многообещающей стратегией для лечения ишемического инсульта. Однако необходимо учитывать роль каждой изоформы HDAC в регуляции выживания или гибели клеток мозга после ишемии. Было показано, что активация HDAC2 и HDAC6 после ФТИ способствует гибели клеток, тогда как, вероятно, HDAC3 обеспечивает их выживаемость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Demyanenko S., Uzdensky A. // Mol Neurobiol. 2017. Vol. 54 (9). P. 6839–6856.
2. Demyanenko S., Uzdensky A. // Int. J. Mol. Sci. 2019. P. 20 (12). pii: E2882.
3. Demyanenko S., Neginskaya M., Berezhnaya E. // Transl. Stroke. 2018. № 9. P. 471–483.
4. Demyanenko S., Berezhnaya E., Neginskaya M. et al. // J. Cell. Biochem. 2019. [Epub ahead of print].

ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ГАНГЛИЯХ ДОРСАЛЬНЫХ КОРЕШКОВ КРЫСЫ ПОСЛЕ ПЕРЕРЕЗКИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

В.А. Дзряян, В.В. Гузенко, С.В. Родькин, В.В. Никул, М.А. Путинова, М.Ю. Бибов

Лаборатория молекулярной нейробиологии Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: dzreyan2016@mail.ru

Нейротравмы приводят к инвалидности и смерти людей, особенно мужчин молодого и среднего возраста. Но нейропротекторы, способные повысить выживаемость нейронов после травмы, пока не найдены [1]. Для исследования молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропротекции, инициируемых аксотомией, мы изучили изменения экспрессии ряда белков, принадлежащих к разным биохимическим подсистемам, в ганглиях дорсальных корешков (DRG) крыс после перерезки седалищного нерва.

Опыты проводили на взрослых самцах крыс. Аксотомию седалищного нерва осуществляли по методике, описанной в статье [2]. Для изучения повреждения нервных клеток извлекали ганглии дорсальных корешков 4-го и 5-го поясничных нервов сразу после декапитации. Контроль – контралатеральные ганглии того же животного.

Для определения апоптоза использовали метод TUNEL с помощью набора реактивов In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Sigma-Aldrich). Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе. TUNEL-позитивные клетки подсчитывали в трёх срезах ганглиев 5-го DGR у трёх животных. Уровень апоптоза нейронов и глиальных клеток ганглиев определяли через 24 ч или через 7 суток после перерезки седалищного нерва. Объем DRG и количество нейронов в нём не изменялись через 1 и 7 дней после перерезки седалищного нерва. Апоптоз отдельных нейронов DRG наблюдался только через 7 дней после аксотомии. Глиальные клетки были более уязвимы. Через 24 ч после перерезки седалищного нерва уровень апоптоза глиальных клеток был втрое выше, чем в контрольных контралатеральных ганглиях, а через 7 дней – в 6 раз.

Для иммуноблоттинга объединяли ганглии дорсальных корешков 4-го и 5-го поясничных нервов от трёх крыс в опытных и контрольных препаратах (1, 4 и 24 ч после аксотомии). Затем образцы гомогенизировали на льду ультразвуковым гомогенизатором в лизирующем буфере, дополненном нуклеазой бензоназа и ингибиторами протеаз и фосфатаз и проводили иммуноблоттинг методом полусухого переноса с использованием Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, США). Для анализа использовали систему гель-документирования Fusion SL (Vilber Lourmat, Франция) и программу Vision Capt. Статистическую оценку достоверности отличий проводили путём однофакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (One Way Anova RM).

Иммуноблоттинг показал повышенную экспрессию убиквитин-гидролазы UCH-L1 в DRG через 24 ч после аксотомии по сравнению с уровнями через 1–4 ч после перерезки седалищного нерва. Но её уровни не отличались от таковых в контрольных контралатеральных ганглиях. Эти изменения были неспецифическими, возможно, связанными с системным ответом нервной системы крысы на локальное повреждение нерва.

Изменения уровней факторов транскрипции p53 и E2F1 и гистондеацетилазы HDAC1 были более специфичными. Мы обнаружили достоверные различия между уровнями p53 в аксотомированных ганглиях по сравнению с контрольными через 24 ч после перерезки седалищного нерва. Кроме того, в подопытных (правых) ганглиях уровень p53 через 4 и 24 ч после аксотомии был достоверно выше, чем через 1 ч. Уровень белка E2F1 в аксотомированных ганглиях был достоверно выше, чем в контрольных, через 4 ч после перерезки седалищного нерва. Через 4 и 24 ч после перерезки седалищного нерва уровень E2F1 в аксотомированных ганглиях был также выше уровня через 1 ч. Гиперэкспрессия E2F1, инициируемая через 4 ч после аксотомии и поддерживаемая в течение 24 ч, вероятно, являлась необходимым звеном регуляции выживаемости и смерти клеток DRG при ухудшении состояния животного и апоптозе аксотомированных клеток [3].

Как показал вестерн-блоттинг, перерезка седалищного нерва крысы вызывала достоверное 2- и 1,4-кратное повышение экспрессии HDAC1 в DRG по сравнению с контролем через 1 и 4, но не 24 ч после аксотомии. При этом общий уровень HDAC1 в контрольных и аксотомированных ганглиях повышался от 1 к 24 ч после аксотомии, в результате возможной неспецифической реакции нервной системы животного на перенесенную нейротравму.

Такие ранние изменения свидетельствуют о регуляторной и пусковой роли этих белков в реакции ганглиев дорсальных корешков спинного мозга крыс на перерезку седалищного нерва. Эти белки могут служить потенциальными маркерами изменений при повреждении нервов и/или мишенями для терапевтического вмешательства. Изучение роли данных белков в повреждении нервных клеток – предмет дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Richardson P.M., Miao T., Wu D. et al. // J. Neurosurgery. 2009 Vol. 65, suppl. 4. P. 74–79.
2. Savastano L.E., Laurito S.R., Fitt M.R. et al. // J. Neurosci. Meth. 2014. Vol. 227. P. 166–180.
3. Meng P., Ghosh R. // Cell death & disease. 2014. № 5. e1360. doi:10.1038/cddis.2014.326

Работа поддержана грантами Минобрнауки РФ, № 6.6324.2017/8.9 и 6.4951.2017/6.7.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ (SkQ1 и SkQ3) НА СКОРОСТЬ РОСТА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ УВЛАЖНЁННОСТИ

Н.Г. Дуплий, А.В. Усатов, А.С. Азаров, А.А. Дворник

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/11
E-mail: duplyi@yandex.ru*

Рост и развитие растений зависят, главным образом, от их обеспеченности продуктивной влагой [1]. При возделывании зерновых культур в условиях аридного климата наряду с традиционными технологиями желателно применять средства защиты растений. К таким средствам относят, в том числе, препараты на основе митохондриальных антиоксидантов [2]. Из ряда антиоксидантов, разработанных под руководством академика В.П. Скулачёва, наибольший интерес представляют 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ3) и (6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ1). Ранее нами было показано увеличение скорости роста растений зерновых культур в условиях дефицита влаги при обработке SkQ3 [3]. Однако влияние SkQ1 на развитие растений при недостатке влаги ранее не изучалось. Целью работы было сравнить действие SkQ1 и SkQ3 на скорость роста зерновых культур при различных режимах увлажнения.

Материалом исследования служили растения озимой пшеницы сорта «Калым» и ярового ячменя сорта «Сокол». Семена замачивали в течение 7 ч в дистиллированной воде (контроль) или в растворах SkQ1 и SkQ3 в концентрации 2,5 нМ. Затем семена проращивали в термостате в течение 36 ч при

температуре 26 °С и далее в контейнерах (по 30 растений) в условиях фитотрона в течение 14 дней при различной влажности почвы. Постоянный уровень влажности поддерживали регулярным поливом по весу. Опыт был проведен в трех повторностях. После окончания эксперимента измеряли сухую массу ростков и корней растений (мг). Результаты количественных показателей суммированы в таблице.

Таблица

Сухая масса ростков и корней растений озимой пшеницы сорта «Калым» и ярового ячменя сорта «Сокол» в различных условиях увлажненности

Вариант опыта	Озимая пшеница сорта «Калым»		Яровой ячмень сорта «Сокол»	
	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг	сухая масса ростка, мг	сухая масса корня, мг
<i>Влажность почвы 70 %</i>				
контроль	18,7±0,3	6,5±0,1	19,5±0,4	8,5±0,3
SkQ1	19,2±0,2	6,9±0,2	20,1±0,4	9,0±0,2
SkQ3	19,8±0,2	6,8±0,2	19,7±0,3	8,9±0,3
<i>Влажность почвы 50 %</i>				
контроль	16,1±0,2	5,2±0,1	17,7±0,3	7,8±0,3
SkQ1	17,9*±0,1	6,7*±0,1	18,2±0,2	8,2±0,3
SkQ3	17,5*±0,2	6,5*±0,1	17,9±0,3	8,3±0,2
<i>Влажность почвы 40 %</i>				
контроль	15,1±0,2	4,3±0,1	16,8±0,2	6,7±0,2
SkQ1	18,1*±0,2	5,7*±0,1	19,3*±0,2	7,8*±0,2
SkQ3	17,9*±0,1	5,9*±0,1	19,4*±0,2	8,3*±0,3
<i>Влажность почвы 30 %</i>				
контроль	10,5±0,2	4,5±0,1	11,2±0,2	3,1±0,2
SkQ1	13,8*±0,2	6,2*±0,1	14,9*±0,3	4,5*±0,2
SkQ3	14,3*±0,1	5,9*±0,1	15,6*±0,3	4,8*±0,2

*Достоверные отличия по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Как видно из таблицы, в условиях физиологически нормальной увлажненности (70 % от влагоемкости почвы) достоверные отличия между сухой массой проростков и корней у обработанных растений по сравнению с контролем отсутствуют. Однако, начиная с 50 % влажности для озимой пшеницы и 40 % влажности для ярового ячменя, масса ростков и корней возрастает у растений в опыте по сравнению с контролем. Таким образом, в условиях дефицита влаги у растений, обработанных растворами SkQ1 и SkQ3, повышается скорость роста по сравнению с контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рымарь В.Т., Чевердин Ю.И. // Земледелие. 2009. №. 5. С. 3–5.
2. Feniouk B.A., Skulachev V.P. // Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics. Springer, Cham, 2018. P. 523–533.
3. Дулий Н.Г., Азаров А.С., Усатов А.В., Попов А.С. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2018. №. 140. С. 60–72.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ НМДА-РЕЦЕПТОРОВ В ГИППОКАМПЕ У КРЫС В МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИАБЕТА

Г.В. Карантыш¹, М.П. Фоменко¹, А.М. Менджеричкий^{1,2}, Е.В. Бутенко¹

¹Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

Сахарный диабет является одним из социально значимых заболеваний, распространённость которого продолжает расти, особенно, в развитых странах [1]. Механизмы, лежащие в основе сахарного диабета и роли инсулина в его развитии, широко описаны в литературе.

Большинство работ, посвящённых инсулину, направлены на изучение его периферических функций. Однако в последние годы активно исследуют механизмы, связанные с ролью инсулина в центральной нервной системе, в первую очередь, с нейрональной пластичностью. При этом, как изменяются процессы, лежащие в основе нейрональной пластичности в условиях развития сахарного диабета, на сегодняшний день остается мало исследованным. В том числе, вызывает интерес, влияет ли развитие сахарного диабета на субъединичный состав НМДА-рецепторов. Целью данного исследования явилось изучение экспрессии генов субъединиц НМДА-рецепторов в гиппокампе у крыс в модели сахарного диабета.

Эксперимент проведён на беспородных белых крысах-самцах весом 200–250 г, которые были разделены на группы: 1 – контрольная группа ($n=16$); 2 – группа животных ($n=16$), у которых моделировали стрептозотоциновый диабет (СД). Относительный уровень транскриптов изучаемых генов в гиппокампе на 24-й день моделирования СД исследовали с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) после обратной транскрипции. Тотальную РНК из тканей гиппокампа выделяли при помощи набора Aurum Total RNA fatty and fibrous tissue kit (BioRad). Количество и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer (Implen). OD260/280 образцов РНК колебалось от 1,80 до 2,00. Тотальную РНК (0,5 мкг) подвергали обратной транскрипции в кДНК в объёме смеси 25 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием реагентов фирмы Евроген (Россия). Дизайн прямых и обратных праймеров фирмы Синтол (Россия) для проведения ПЦР-РВ проводили в программе Primer3 с последующей проверкой в IDT. ПЦР-РВ была проведена на амплификаторе CFX-96 фирмы Bio-Rad. Расчёт относительной экспрессии проводили, оценивая величины C_t (Threshold cycle), получаемые в ходе проведения ПЦР-РВ. Далее сравнивали уровни экспрессии исследуемых генов в опытных и контрольных образцах с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Как известно, НМДА-рецепторы являются динамичными образованиями, изменение субъединичного состава которых способствует развитию синаптической пластичности [2]. В модели стрептозотоцинового диабета происходило изменение уровня экспрессии генов субъединиц глутаматных НМДА-рецепторов в гиппокампе: на 24-й день эксперимента уровень транскриптов генов *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b* снижался, тогда как уровень экспрессии гена *Grin2d*, напротив, возрастал.

В норме в гиппокампе GluN2A и GluN2B являются основными регуляторными субъединицами этих рецепторов: их экспрессия динамично и строго регулируется. Их снижение в модели СД свидетельствует о дегградации НМДА-рецепторов, что, вероятно, будет влиять на процессы, определяющие эффективность обучения. Уменьшение же GluN2B связывают с понижением количества клеток гипоталамуса, синтезирующих агути-подобный белок, что, в результате, приводит к снижению массы тела, жировой ткани и потребления пищи [3]. Изменения экспрессии гена *Grin2d* при развитии СД противоположна тому, что наблюдают в физиологических условиях: в норме уровень его экспрессии снижается уже в начале постнатального периода [4]. Таким образом, в условиях стрептозотоцинового диабета происходит изменение субъединичного состава НМДА-рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. и др. // Сахарный диабет. 2018. Т. 21. № 3. С. 144–159.
2. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. // Nat. Rev. Neurosci. 2013. Vol. 14. P. 383–400.
3. Shang Y., Zhang J., Huang E.J. // J. Neurosci. 2018. Vol. 38 (16). P. 4006–4019.
4. von Engelhardt J., Bocklisch C., Tönges L. et al. // Front. Cell. Neurosci. 2015. Vol. 9. P. 95.

МЕЖНЕЙРОНАЛЬНЫЕ И МЕЖГЛИАЛЬНЫЕ ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Е.Ю. Кириченко¹, А.К. Логвинов¹

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru; a.k.logvinov@yandex.ru

Щелевые контакты (ЩК) занимают особое место среди различных типов межклеточных соединений и представляют собой два состыкованных полуканала, называемых коннексаонами, при этом субъединицей каждого коннексаона является трансмембранный белок коннексин. Нейрональные и глиальные ЩК при схожих морфологических характеристиках могут иметь различное функциональное назначение. Так, например, щелевые контакты нейронов объединяют однотипные «быстро-спайковые» нейроны в элементарный ансамбль и электротонически синхронизируют пейсмекерные волны гиперполяризации нейронов этого ансамбля, когда импульсная активность еще подавлена. Благодаря формированию межклеточных глиа-глиальных щелевых контактов, астроглия может приобретать функцию пространственного буфера для регуляции экстраклеточной концентрации калия и других ионов, обеспечивая внутриклеточный и экстраклеточный ионный гомеостаз.

Отдельно следует отметить, что роль щелевых контактов при развитии глиальных опухолей до сих пор является неоднозначной. С одной стороны, было показано, что патогенез этих новообразований может быть связан с нарушением межклеточных взаимодействий посредством щелевых контактов [1]. С другой стороны, в наших ультраструктурных исследованиях отмечено сохранение этого типа соединений между телами и отростками опухолевых клеток в гемистоцитарной астроцитоме Grade II, плеоморфной ксантоастроцитоме Grade II, анапластической астроцитоме Grade III, глиобластоме Grade IV [2].

Все идентифицированные нами щелевые контакты в глиальных опухолях имели типичную ультраструктуру без видимых перфораций, соединяли сомы крупных опухолевых клеток, содержащих большое количество глиофибрилл. Этот вид щелевых контактов имел удлинённый нексус (около 1250 нм), что указывает на прямой межклеточный перенос большого количества различных молекул между опухолевыми клетками. Кроме того, щелевые контакты были обнаружены в нейропиле опухоли между тонкими отростками, заполненными глиофибриллами, в непосредственной близости от опухолевой клетки. Наши результаты указывают на роль щелевых контактов как основы межклеточной коммуникации между клетками глиомы, что может вносить большой вклад в прогрессирование опухоли. По нашему мнению, щелевые контакты следует рассматривать в качестве важной стратегической цели для лечения глиальных опухолей головного мозга. На основе этого подхода могут быть разработаны новые эффективные методы низкодоксичной химиотерапии и преодоления лекарственной устойчивости опухолей, в том числе благодаря открытию феномена «метаболической кооперации» – повышения чувствительности злокачественных клеток к цитостатикам в результате межклеточных взаимодействий через щелевые контакты [3]. Отдельно следует отметить имеющиеся сведения и о самостоятельной онкосупрессорной или протоонкогенной активности белка щелевых контактов астроцитов – коннексина 43, обусловленной взаимодействием его карбоксильного С-конца с веществами, участвующими в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Trosko J.E., Chang C.C. // *Mutat. Res.* 2001. Vol. 480–481. P. 219–229.
2. Kirichenko E.Yu., Savchenko A.F., Kozachenko D.V. *Et al.* // *Archive of pathology.* 2017. Vol. 79, № 1. P. 3–11
3. Trosko J.E., Ruch R.J. // *Curr Drug Targets.* 2002. № 3 (6). P. 465–482.
4. Tabernero A., Gangoso E., Jaraíz-Rodríguez M., Medina J.M. // *Neuroscience.* 2016. Vol. 323. P. 183–194.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00325/19

КЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ

*М.Ю. Копеева¹, А.М. Азиева¹, А.В. Смирнова¹, А.Б. Черепов¹, М.В. Нестеренко²,
И.Ю. Зарайская¹*

¹НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Российская Федерация, г. Москва, пл. Академика Курчатова, 1

²ООО «Лактобио», 119311, Российская Федерация, г. Москва, Ломоносовский пр., 23

E-mail: kopayeva_my@nrcki.ru

В биомедицинских исследованиях всё большее распространение получают микрофизиологические *in vitro* системы на основе первичных культур нервных клеток. С их помощью проводятся успешные испытания новых лекарственных препаратов, токсических и физиологических эффектов различных химических соединений. В качестве потенциальных молекулярных маркеров, отражающих физиологическую активность отдельных клеток, могут быть использованы продукты внутриклеточной экспрессии индуцируемых нервной активностью генов. Лактоферрин (Лф) – полифункциональный белок из семейства трансферринов – широко представлен в различных секреторных жидкостях млекопитающих. Одним из важных свойств Лф является его способность взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами. Белок может связываться с определёнными последовательностями ДНК, активируя транскрипцию [1]. Ранее было показано, что Лф модулирует широкий спектр нейрональных процессов посредством изменения экспрессии генов, среди продуктов которых присутствуют регуляторные и эффекторные белки (BDNF, CREB, CAMK и др.) [2, 3]. Также были выявлены высокоспецифичные места связывания человеческого Лф (чЛф) в ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии в мозге мыши [4]. Однако в большинстве случаев иммунореактивность Лф была локализована только в цитоплазме.

Целью исследования являлось определение клеточной локализации человеческого Лф в клетках культуры головного мозга мышей в норме и колокализации экзогенного белка с индуцированной экспрессией транскрипционного фактора c-Fos.

Первичные диссоциированные клеточные культуры получали из гиппокампа и коры головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57B1/6. Индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках осуществляли путём трёхкратного добавления 50 мМ KCl в культуральную среду [5]. За 24 ч до стимуляции в культуральную среду группы «KCl+Лф» добавляли чЛф (1 мг/мл). В работе был использован Лф, выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии. Иммуногистохимический (ИГХ) анализ содержания c-Fos проводился через 2 ч после стимуляции. Окрашенные срезы оцифровывали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV10i и анализировали в программе Bitplane Imaris 7.4.2. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 6 с использованием непараметрического теста Манна-Уитни.

Флюоресцентное ИГХ-окрашивание выявило цитоплазматическую локализацию чЛф в клетках интактных (без стимуляции) культур через 2, 24 и 72 ч после введения белка в культуральную среду. После стимуляции 50 мМ KCl чЛф детектировался как в цитоплазме, так и в ядрах отдельных клеток культуры. В ядрах некоторых клеток была выявлена колокализация включения чЛф и экспрессии c-Fos. Исследование показало, что стимуляция вызывала индукцию экспрессии белка c-Fos в культурах клеток гиппокампа мышей, значительно отличающуюся от контроля («KCl» $0,3000 \pm 0,0416$ vs «контроль» $0,1580 \pm 0,0061$, относит. интенсивность экспрессии; $p=0,0035$). Не выявлено влияние введения чЛф (за 24 ч до стимуляции) на интенсивность экспрессии c-Fos («KCl+Лф» $0,3000 \pm 0,0322$ vs «контроль» $0,1580 \pm 0,0061$, относит. интенсивность экспрессии; $p=0,0035$).

В настоящей работе с помощью флюоресцентного ИГХ-окрашивания впервые показана ядерная локализация экзогенного чЛф и его колокализация с белком c-Fos после стимуляции 50 мМ KCl культур клеток гиппокампа мышей. Для дальнейшего изучения роли чЛф в клеточных нейрональных процессах планируется исследовать индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках культуры при постоянном

присутствии экзогенного белка в культуральной среде, определить фенотип клеток с различной клеточной локализацией чЛф.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gifford J.L., Ishida H., Vogel H.J. // PLoS One. 2012. Vol. 7. № 12. e51026.
2. Chen Y., Zheng Z., Zhu X. et al. // Mol Neurobiol. 2015. Vol. 52. P. 256-269.
3. Wang B. // J Pediatr. 2016. Vol.173. Suppl. P. S29-36.
4. Конаева М.Ю., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Нестеренко М.В. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019. №2. С. 106–113.
5. Schoenenberger P., Gerosa D., Oertner T.G. T // PLoS One. 2009. Vol. 4. № 12. e8185.

Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Курчатовского комплекса НБИКС-технологий.

ВЛИЯНИЕ ОДОРАНТОВ РАЗНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЭГ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ВЕРБАЛЬНЫХ И НЕВЕРБАЛЬНЫХ ЗАДАЧ

О.Л. Кундурьян, Е.К. Айдаркин, Ю.Л. Кундурьян, А.Н. Старостин, М.Ю. Бибов

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: olkunduryan@srfedu.ru; aek@srfedu.ru; julia_leo@mail.ru; anstarostin@srfedu.ru; mbibov@gmail.com*

По данным ряда исследователей влияние ароматических веществ на функциональное состояние человека обусловлено функционированием двух механизмов: сенсорного и гуморального. В литературе слабо изучено влияние одорантов разной направленности на нейрофизиологические механизмы решения вербальных и невербальных задач. Целью нашего исследования было изучить влияние эфирных масел разной направленности на спектральные показатели ЭЭГ при выполнении вербальных и невербальных задач.

В исследовании участвовали 38 практически здоровых обследуемых, средний возраст – 25 лет. Использовали методику поэтапного решения вербальных и невербальных задач с детальным анализом каждого слайда. Каждый обследуемый должен был проанализировать 100 слайдов для каждой задачи в контроле и на фоне ароматических масел, исключая неподходящее по смыслу слово или картинку на слайде. Во время выполнения теста регистрировали время реакции (ВР) и ЭЭГ. Оцифрованные данные регистрируемых ЭЭГ и ВР экспортировали в программную среду MATLAB, где проводили обработку результатов.

Анализ времени реакции показал, что в контроле вербальные и невербальные задачи решаются быстрее с участием левой руки, что вероятно связано с моторной преднастройкой. Внесение одорантов разной направленности ускоряло время решения вербальных и невербальных задач и меняло характер моторной преднастройки. Спектральные характеристики ЭЭГ в контроле показали, что выполнение невербальных заданий сопровождалось активацией передней системы внимания в диапазоне дельта-, тета- и бета2-активности, а решение вербальных задач приводило к активации передней и задней системы внимания. Выполнение вербальных заданий сопровождалось мощной активацией бета1- и бета2-активности, а решение невербальных задач происходило при усилении альфа-активности в затылочных областях коры. Выполнение невербальных задач в присутствии розмарина и лаванды вызывало активацию передней и задней систем, а внесение в экспериментальную среду Melissa активировало заднюю систему внимания в диапазоне тета-, бета1- и бета2-активности. Решение вербальных задач в присутствии одорантов Melissa и лаванды активировало переднюю систему

внимания, а в присутствии розмарина – переднюю и заднюю систему внимания в диапазоне тета-, бета1- и бета2-активности.

Таким образом, внесение одорантов в экспериментальную среду в процессе решения когнитивных задач достоверно уменьшало время решения заданий. Одоранты увеличивали амплитуду всех исследуемых видов активности по сравнению с контролем, особенно в диапазоне тета-, бета1- и бета2-активности, а также вызывали активацию различных систем внимания.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РУССКОГО СОБОЛЯ *Martes zibellina* L.

Е.С. Левенкова¹, С.Н. Каштанов²

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский пр., 33

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3
E-mail: e-leven@mail.ru; snkashtanov@mail.ru

Соболь в течение столетий остаётся основным промысловым видом России, что не только составляет важную часть российского экспорта пушнины, но и обеспечивает занятость населения отдалённых районов. Кроме того, ежегодная добыча сотен тысяч диких особей предоставляет возможность для изучения биологии этого вида, в том числе сравнительных генетических исследований. На всём огромном ареале от Предуралья до Дальнего Востока, включая полуостров Камчатка и остров Сахалин, представлен один вид *Martes zibellina* с высокой фенотипической изменчивостью, связанной как с размерами, так с окраской и длиной волосяного покрова. Исторически на этой основе было выделено 17 условных подвидов [1], получивших название от их географической локации (витимский, баргузинский и др.). Однако зверей с разным фенотипом встречают на всем ареале, а межпопуляционные различия связаны в основном с долей сходных по фенотипу особей. Например, число особей с тёмным окрасом меха, имеющим самую высокую стоимость на рынке пушнины, варьирует от менее одного процента на юго-востоке ареала до более половины всей добычи охотников в некоторых центрально-сибирских областях. Привлечение краниологических данных к ревизии подвидовой структуры соболя, осложнённой впоследствии наличием интродуцентов, не прояснило его таксономию, было предложено ограничить её выделением нескольких форм: тобольско-алтайской, среднесибирской (енисейской), южно-сибирской (дальневосточной) и камчатской [2, 3].

Кариотип соболя *M. zibellina* ($2n=38$, $NF=66$) сходен с таковым у других представителей рода *Martes*, стабилен у всех изученных особей из разных популяций. Молекулярно-генетические данные, полученные на обширном материале из географически удалённых районов с применением разных маркеров, выявили в целом значительную генетическую изменчивость *M. zibellina*, максимальную однородность по представленности гаплотипов в центральной части ареала, наличие уникальных последовательностей для популяций по-ва Камчатка и о. Сахалин [4–6]. Это позволило приступить к построению эволюционной модели распространения соболя и частично объяснить видовые особенности заселения ареала. Так, высокая генетическая изменчивость служит основой адаптаций к неоднородным, иногда кардинально различным факторам среды, а единство вида и свойственная соболю миграционная активность обеспечивает свободный поток генов на основной части занимаемой им территории.

Дополнительные возможности для понимания таксономии, эволюционной истории вида, его филогенетических связей представляет изучение генетики популяций на краю ареала, в том числе изолированных крупными водными преградами. Так, на острове Сахалин и полуострове Камчатка, как и на материке, фенотипы соболя представлены разнообразием, тёмный мех встречают не менее,

чем у 5–10 % особей. Тем не менее своеобразие этих популяций отражено в выделении на основе фенотипических особенностей сахалинского и камчатского подвидов соболей. Наличие уникальных гаплотипов у соболя Камчатки и Сахалина может быть связано как с сохранением предковых вариантов, сходных с таковыми у близких видов куниц, так и с формированием генетического своеобразия в условиях длительной изоляции. Отметим, что и у других близких видов *Martes* выявлены особенности популяций, изолированных морскими проливами. Например, американский соболь острова Ньюфаундленд имеет генетические отличия от остальных *M. americana*, генетически однородных на всей материковой территории Канады [7], а у европейской куницы *M. martes* островной популяции Англии обнаружены гены *M. americana* [8]. Изучение своеобразия островных изолятов видов *Martes*, исторической роли крупных водных преград, взаимопроникновения генетических маркеров одного вида в геном другого, наиболее выраженное на границах их ареалов, позволяет реконструировать эволюционную историю и филогенетические связи видов этого рода [9–10]. Работа по уточнению таксономии и оценке биоразнообразия соболя на основе генетических данных может быть востребована при решении практических задач по рациональному использованию и сохранению этого вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гентнер В.Г., Наумов Н.П. и др. Млекопитающие Советского Союза: В 3 т. Т. 2. Ч. 1. М.: Высшая школа, 1967. С. 507–553.
2. Монахов В.Г. // Экология, 2015. № 3. С. 219–228.
3. Монахов Г.И. // Тр. ВНИИОЗ. 1976. Вып. 26. С. 54–86.
4. Рожнов В.В., Пищулина С.Л., Мецкерский И.Г. и др. // Генетика, 2013. Т. 49, № 2. С. 251–258.
5. Капитанов С.Н., Свищёва Г.Р., Пищулина С.Л. и др. // Генетика. 2015. Т. 51, № 1. С. 78–88.
6. Капитанов С.Н., Столповский Ю.А., Мецкерский И.Г. и др. // Генетика. 2018. Т. 54, № 11. С. 1327–1337. DOI: 10.1134/S0016675818110073.
7. Kyle C.J., Strobeck C. // Can. J. Zool. 2003. Vol. 81. P. 57–66. Doi: 10.1139/Z02-223
8. Kyle C.J., Davison A., Strobeck C. // Conservation Genetics. 2003. № 4. P. 179–188.
9. Ishida K., Sato J.J., Kinoshita G. et al. // Acta Theriol. 2013. Vol. 58. P. 13–24. Doi: 10.1007/s13364-012-0103-z
10. Kinoshita G., Sato J.J., Meschersky I.G. et al. // Journal of Mammalogy. 2015. Vol. 96 (1). P. 172–184. Doi:10.1093/jmamma/gyu021.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ ЛОТОСА ОРЕХОНОСНОГО В АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Н.А. Ломтева, Е.И. Кондратенко, С.К. Касимова, Н.В. Нетипанова

Астраханский государственный университет», 414000, Российская Федерация, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1

E-mail: molecula01@yandex.ru; cond70@mail.ru

Целью работы было исследование морфологических и эколого-биологических особенностей ценопопуляций лотоса орехоносного в дельте р. Волга. Для изучения ценопопуляций лотоса были заложены две пробные площадки, расположенные на территории поселка Кирпичный завод № 1 Приволжского района по берегу р. Царев и на территории с. Диановка Володарского района Астраханской области по берегу реки Бузан размером 3х6 м. Площадь первой популяции: длина 40 м, ширина 9 м (360 м²). Возраст популяции 5 лет. Площадь второй популяции: длина 15 м, ширина 7 м (105 м²). Возраст популяции 2 года. При заложении пробных площадок были выбраны участки с наиболее усредненными показателями проективного покрытия на расстоянии 2 м от берега. Наблюдения и морфометрические измерения производились с мая по сентябрь. При проведении морфометрических исследований в каждой

из пробных площадок проанализировано шесть количественных признаков: количество надводных, высоко поднимающихся над водой листьев; длина и ширина листовая пластинки; количество бутонов; длина бутона; диаметр цветка; диаметр коробочки.

В изучаемых популяциях лотос произрастает в воде на глубине 0,2–1,2 м, максимальных показателей проективного покрытия и морфометрических характеристик достигает на глубине 0,7–1,0 м. Исследуемые популяции характеризуются узким ленточным расположением вдоль берега водоема шириной 7–9 м.

Анализ морфометрических показателей популяции, расположенной на территории поселка Кирпичный завод № 1 показал, что средний диаметр листьев, составляет 44,0 x 45,2 см; минимальный – 21,0 x 22,0; максимальный – 52,0 x 59,0 см. При подобном диаметре листовых пластинок проективное покрытие в сообществе составляет преимущественно 100 %, что ограничивает возможности развития других видов водных растений. Цветки на длинных цветоножках, приподнятые над поверхностью воды, средний диаметр 23,0 см, минимальный – 20,0, максимальный – 26,0 см. Количество цветков на пробных площадках (3x6 м) колеблется от 14 бутонов в начале цветения до 121 во время пика цветения. Максимальных значений показателей проективного покрытия и морфометрических характеристик ценопопуляция лотоса орехоносного, расположенная на территории поселка Кирпичный завод № 1, достигает в начале августа.

Анализ морфометрических показателей популяции, расположенной на территории с. Диановка Володарского р-на показал, что средний диаметр листьев составляет 33,0 x 36,8 см, средний диаметр цветка 21,0 см. Количество бутонов на пробных площадках (3x6 м) колеблется от 10 бутонов в начале цветения до 42 во время пика цветения.

Морфометрические характеристики цветка являются важным критерием в классификации сортов лотоса в Китае и Таиланде. При молекулярных исследованиях генетического родства гибридов между *Nelumbo nucifera* и *N. lutea* цветок и корневища лотоса показывают явные генетические различия.

Сравнительный анализ морфометрических показателей лотоса орехоносного изучаемых популяций показал, что все значения, зафиксированные при анализе популяции на территории села Диановка, меньше, чем в популяции поселка Кирпичный завод № 1. (рис.). Возможно, это связано с возрастом популяции, температурой воды и почвы.

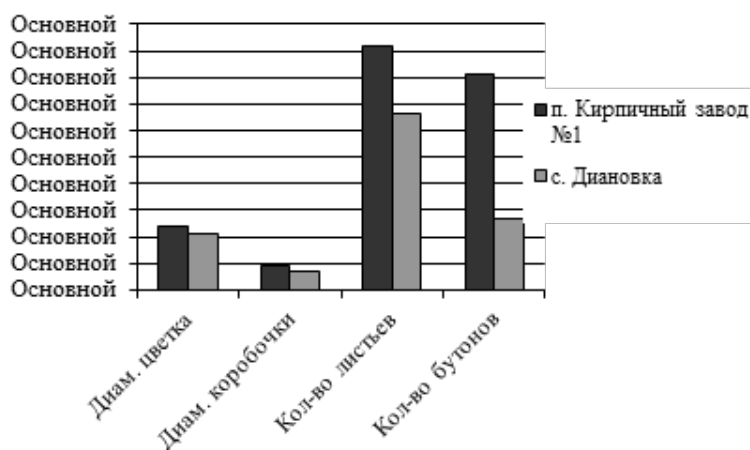


Рис. Сравнительный анализ морфометрических показателей ценопопуляций лотоса орехоносного п. Кирпичный завод №1 Приволжского р-на и с. Диановка Володарского р-на Астраханской области

В растительном покрове дельты р. Волги в течение около двух десятков лет идут процессы, связанные с увеличением увлажнения этой территории и уменьшением засоления почвы. Динамика встречаемости и численности ценопопуляций *Nelumbo nucifera* по годам определяется влиянием ряда природных и антропогенных факторов и имеет в целом положительную тенденцию. В последнее время наблюдается увеличение количества популяций лотоса орехоносного в связи с искусственным высаживанием семян и корневищ по берегам водоёмов вблизи населенных пунктов.

«ДОРОЖНАЯ КАРТА» ПРОДЛЕНИЯ ЖИЗНИ: ЗНАЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

А.В. Лысенко

*Академия физической культуры и спорта, Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, Зорге, 21 Ж
E-mail: alysenko@sfnedu.ru*

Первые два десятилетия XXI века ознаменовались бурным развитием и внедрением в повседневную жизнь цифровых технологий, роботизированных систем и даже искусственного интеллекта. Это, с одной стороны, делает существование современного человека более комфортным, однако, с другой стороны, постоянно увеличивающееся информационное и экологическое давление, наряду с уменьшением двигательной активности, растущим темпом и ритмом жизни, может способствовать преждевременному старению и ухудшению здоровья населения.

Известно, что продолжительность жизни и здоровье населения, рассматриваемые сегодня как составляющая государственной безопасности, зависят в основном от трёх факторов: наследственности, среды обитания и образа жизни, качества и структуры питания.

Рассматривая первый фактор (наследственность), многие авторы возлагают большие надежды на генную инженерию долголетия, в том числе на технологии редактирования генома. В аспекте образа жизни (второй фактор), по мнению большинства специалистов, с каждым годом возрастает значение оптимальной по продолжительности и интенсивности двигательной активности, геропротекторный эффект которой описан в большом количестве экспериментальных исследований. Существуют доказательства влияния оптимальных физических нагрузок на активность теломеразы и интенсивность процессов аутофагии. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что при воздействии стресс- и геропротекторных препаратов и оптимальных двигательных режимов улучшается физическая и умственная работоспособность, нормализуются параметры метаболизма, активизируется работа антиоксидантной системы, снижается интенсивность образования свободных радикалов и склонность к мутациям хромосом в клетках, повышаются адаптационные возможности организма и иммунитет.

Тем не менее улучшение первых двух факторов – процесс сложный, долговременный и требует совместных усилий многих государственных учреждений. Изменить питание (третий фактор) можно самостоятельно, обладая информацией о том, как это сделать. Опыт зарубежных стран и отечественных специалистов доказывает, что достижение активного долголетия возможно благодаря внедрению в систему питания (особенно спортивного) биологически активных добавок (которые нельзя путать с пищевыми добавками, такими как красители, консерванты, стабилизаторы и т.п.). Неслучайно биологически активные добавки (БАД) названы «пищей XXI века». Благодаря БАД возможна организация управления скоростью старения, процессами поддержания и восстановления здоровья спортсменов и населения в целом. С одной стороны, никакая добавка не может сделать продуктивным изначально неправильный тренинг, но с другой стороны, можно успешно комбинировать применение БАД и достижения спортивной генетики.

Для правильного решения проблемы сохранения здоровья в эпоху недостатка двигательной активности и информационных перегрузок большое внимание привлекает анализ генетической вариабельности таких генов как *FABP2*, *PPARG*, *ADRB2* и *ADRB3* (в результате получается информация

о скорости и эффективности усвоения питательных веществ, можно оптимизировать профиль питания и определить, насколько высокоинтенсивными должны быть нагрузки для достижения оптимального тренировочного эффекта). Перспективность использования БАД на основе пептидов подтверждается тем, что действие большинства синтетических допинговых препаратов направлено на «выжимание» из мышц спортсмена максимальной работоспособности. БАД, напротив, оказывают качественно другое воздействие. Короткие пептиды из 3–4 аминокислот способны взаимодействовать с ДНК, регулируя экспрессию генов. Низкая молекулярная масса позволяет пептидам беспрепятственно проникать в поврежденные ткани, в клетках которых пептиды стимулируют выработку необходимого количества активных веществ в нужном биологическом ритме, в зависимости от индивидуальных потребностей организма, и запускают процессы саморегуляции, восстанавливая нормальную функцию поврежденных тканей. Нами проанализированы результаты применения более 20 пептидных препаратов и БАД на основе пептидов. Проведён сравнительный анализ эффективности воздействия этих продуктов на функции внутренних органов, физическую и умственную работоспособность, энергообмен, иммунный статус организма и пределы адаптационных возможностей спортсменов и представителей других профессиональных групп, деятельность которых связана с воздействием на организм различных неблагоприятных факторов производственной среды и производственного процесса.

Полученная нами информация может быть важной для профессиональных спортсменов и любителей, а также врачей и диетологов, так как позволяет дать более точную оценку индивидуальным особенностям организма и подобрать индивидуальную формирующую здоровье программу для достижения активного долголетия.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕОХИМИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Т.А.-Мараховская¹, Н.Э. Скобликов²

¹Южный федеральный университет, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Краснодарский научный центр зоотехнии и ветеринарии, 350055, Российская Федерация, г. Краснодар, пос. Знаменский, ул. Первомайская, 4

E-mail: tmarakhovskaya@mail.ru; skoblikow@yandex.ru

Систематизация теоретических положений и первые предложения по экспериментальному подтверждению возможного минерал-опосредованного возникновения различных макромолекулярных систем и живых клеток традиционно отсчитываются от фундаментальной работы J. Bernal [1]. Впоследствии было высказана гипотеза “genetic takeover” – происхождения генетических систем от поверхности минеральных матриц [2]. В качестве главных акторов абиогенного синтеза биополимеров рассматриваются, в том числе, минералы фосфатной природы. Установлена способность катализировать в абиогенных условиях образование пептидных связей полифосфатами [3] и нерастворимыми фосфатными минералами – апатитами [4]. Это привело к разработке теоретической концепции, согласно которой специфическое связывание аминокислот и их последующая полимеризация в линейные пептиды осуществлялись на поверхности фосфатных минералов, поверхностно модифицированных азотистыми гетероциклическими соединениями – предками современных азотистых оснований [5, 6]. Такие минерал-органические частицы являются структурными и функциональными предшественниками носителей генетической информации и её реализаторов. Регулярность структуры минеральной поверхности определила дальнейшие стереохимические параметры будущих линейных биополимеров – нуклеиновых кислот, а комбинирование ковалентно несвязанных пар азотистых оснований – специфическое связывание с боковыми цепями аминокислот перед последующим синтезом пептидов.

Три основных этапа предбиологической эволюции – синтез первичных органических соединений, поликонденсация мономеров в полимеры и образование гибридных макромолекулярных

структур – рассмотрены в рамках единого геохимического сценария [7]. Ключевой этап – поликонденсация аминокислот в пептиды – выявил существенные ограничения при экспериментальном подтверждении при проведении в водной стационарной среде. Нами предложены особые локальные геохимические условия (условия пост-вулканического горячего органического потока), подходящие для экспериментов по пребиотической поликонденсации аминокислот в пептиды как основа для моделирования первых генетических систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernal J.D. The physical basis of life. Routledge and Kegan Paul. London, 1951.
2. Cairns-Smith A.G. Genetic Takeover and the Mineral Origins of Life. Cambridge University Press, 1982.
3. Chetkauskaite A.V., Grinius L.L., Mukhin L.M. // Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 1988. Vol. 24. P. 465–470.
4. Acevedo O.L., Orgel E.L. // Origins Life. 1987. Vol. 18. P. 441.
5. Skoblikov N.E., Zimin A.A. // Mathematical Biology and Bioinformatics. 2015. Vol. 10, № 1. P. 116–130. Doi: 10.17537/2015.10.116
6. Skoblikov N.E., Zimin A.A. // J Mol Evol. 2016. Vol. 82, Issue 4. P 163–172. Doi: 10.1007/s00239-016-9736-x
7. Skoblikov N.E., Zimin A.A. // J. Mol. Evol. 2018. Vol. 86, Issue 3–4. P. 172–183. Doi: 10.1007/s00239-018-9839-7

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-44-230040-р_а.

ИЗУЧЕНИЕ МИГРАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ЛЁГКИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Т.В. Миллер, Г.В. Карантыш, А.Н. Вовк

*Научно-исследовательский технологический Центр нейротехнологий Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194
E-mail: mylrtynh@gmail.com; karantyshgv@mail.ru; lgo.i2016@yandex.ru*

Клеточная терапия – потенциал для лечения широкого круга заболеваний. Изучение закономерностей миграции клеток в лимфоидные и не лимфоидные органы после трансплантации различных популяций клеток костного мозга несомненно является обязательным этапом при разработке клеточной терапии различных заболеваний.

Актуальность исследования связана с тем, что эффективность клеточной терапии напрямую зависит от миграции трансплантированных клеток костного мозга. Определяющим критерием эффективности клеточной терапии является правильный выбор клеточного материала.

Целью данного исследования является изучение миграции и распределения *in vivo* неразделенной популяции донорских клеток костного мозга самцов линии СВА в легкие, после трансплантации в организм интактных сингенных реципиентов самок с использованием в качестве маркера *sry*-гена Y-хромосомы.

Сравнительный анализ распределения клеток донорского происхождения, проводился с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полуколичественное определение маркера в лёгких проводилось при помощи программного обеспечения Quantity One в денситометре Geldok (Bio-Rad) в единицах оптической плотности (ЕО) ампликонов электрофореграммы.

Неразделенная популяция клеток костного мозга мигрирует во все сроки после трансплантации, что определялось с помощью маркера *SRY*-гена Y-хромосомы в лёгких. Интенсивность миграции изменяется, и зависит от срока после введения клеток костного мозга. Так, максимальные показатели миграции и/или накопления *SRY*-позитивных клеток донора в лёгких были обнаружены через 1 ч, а минимальные – через 1 месяц после трансплантации. Показатели миграции клеток костного мозга в

лёгкие, измеряемые в разные временные интервалы после трансплантации, имеют следующие значения: 1 ч – 490,7 ЕО; 1 сутки – 1910,3 ЕО; 1 месяц – 1004,5 ЕО; 3 месяца – 1958 ЕО; 6 месяцев – 1948,4 ЕО.

Результаты данного опыта позволяют сказать, что неразделённая популяция клеток костного мозга мигрирует в лёгкие и имеет склонность к относительному увеличению показателей распределения клеток донорского происхождения в разные сроки после внутривенной трансплантации.

Данное исследование в дальнейшем поможет лучше понять механизмы миграции и/или распределения различных популяций клеток в лимфоидные и не лимфоидные органы, для разработки новых, более эффективных и информативных методов диагностики.

МОДИФИКАЦИЯ СОСТАВА ЛИПИДНЫХ ГРАНУЛ В ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

**В.А. Напримеров^{1,4}, К.А. Окотруб², Е.Ю. Брусенцев¹, Т.Н. Игонина¹, С.В. Раннева^{1,3},
Э.А. Чуйко^{1,3}, И.Н. Рожкова¹, В.И. Мокроусова^{1,3}, С.Я. Амстиславский^{1,3}**

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10

²Институт автоматики и электрометрии СО РАН, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. ак. Коптюга, 1

³Новосибирский государственный университет, 630090, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

⁴Новосибирский государственный аграрный университет, 630039, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

E-mail: amstis@yandex.ru; nva61@bionet.nsc.ru

Криоконсервация преимплантационных эмбрионов некоторых млекопитающих, как представителей дикой фауны, так и домашних животных, до сих пор остаётся недостаточно эффективной и нуждается в усовершенствовании. Имеются свидетельства того, что повышенное содержание внутриклеточных липидов у отдельных видов сельскохозяйственных животных, в частности в ооцитах и эмбрионах свиней, препятствует успеху их криоконсервации, однако механизмы этого влияния остаются мало изученными. Это в равной мере относится и к отряду хищных (*Carnivora*), среди которых имеются ценные для пушного звероводства виды, а также редкие и исчезающие представители дикой фауны, в частности большинство представителей семейства кошачьих. Одним из подходов к изучению этой проблемы может быть направленное изменение качественного и количественного состава внутриклеточных липидов в ооцитах и эмбрионах перед их криоконсервацией. Целью работы являлось изменение качественного состава внутриклеточных липидов в дробящихся эмбрионах мышей и домашней кошки в сторону увеличения степени ненасыщенности в процессе их развития *in vitro* с добавлением ненасыщенной жирной кислоты – в данном случае линолевой.

Преимплантационные эмбрионы мышей были получены от самок линии CD1 после процедуры естественного спаривания и извлечены из репродуктивных путей на ранних стадиях дробления (2–4 клетки). Эмбрионы домашней кошки были получены *in vitro* при помощи экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Для процедуры ЭКО эпидидимальное семя и ооциты домашней кошки доставляли из ветеринарных клиник г. Новосибирска. После получения эмбрионов их культивировали *in vitro*. При этом мышьи эмбрионы культивировали в течение 48 ч в среде KSOM (EmbryoMax®) либо без добавления, либо с добавлением линолевой кислоты (100 мкМ или 200 мкМ), а кошачьи эмбрионы культивировали в течении 120 ч в среде Ham's-F10 (Merck) либо без добавления, либо с добавлением линолевой кислоты (400 мкМ).

Эксперимент с эмбрионами мышей проводили в трёх независимых измерениях, на каждую исследованную группу было взято, в общей сложности, 6–7 эмбрионов, в каждом из которых были проанализированы 2–3 липидные гранулы. На кошках было проведено два независимых эксперимента, в каждом изучали по два контрольных эмбриона и три тестовых. Для каждого эмбриона исследовали 6–10 липидных гранул.

Для исследования степени ненасыщенности липидов были измерены спектры комбинационного рассеяния света (КРС) от липидных гранул эмбрионов, как описано нами ранее для мышей [1] и кошек [2]. Для оценки изменений в степени ненасыщенности липидов исследовали отношение интенсивности линии КРС, соответствующей колебаниям двойной С=С связи к пикам CH_2 и С=О колебаний. Для эмбрионов мыши использовалось соотношение интенсивностей линий С=С связи к симметричным CH_2 колебаниям ($I_{\text{C=C}}/I_{\text{SCH}}$). В случае эмбрионов домашней кошки использовалось соотношение интенсивностей между линиями КРС С=С связи и карбонильной группы ($I_{\text{C=C}}/I_{\text{C=O}}$). Показано что оба подхода позволяют отслеживать изменения в степени ненасыщенности, однако соотношение $I_{\text{C=C}}/I_{\text{C=O}}$ оказалось более точным параметром, менее подверженным к изменениям поляризационных условий эксперимента.

Было установлено, что добавление в питательную среду линолевой кислоты (100 μM и 200 μM) при культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов мышей, достоверно ($p < 0,05$) повышает уровень ненасыщенности внутриклеточных липидов по сравнению с контролем. При культивировании с 200 μM линолевой кислоты степень ненасыщенности липидов в эмбрионах мыши возросла почти вдвое. Было также показано, что добавление в питательную среду линолевой кислоты в дозировке 400 μM при культивировании *in vitro* полученных путем ЭКО преимплантационных эмбрионов домашней кошки приводит к ~7 %-ному возрастанию степени ненасыщенности внутриклеточных липидов по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таким образом, в ходе проведённых экспериментов удалось изменить качественный состав внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах мыши и домашней кошки в сторону ненасыщенности жирных кислот благодаря их культивированию *in vitro* в среде с добавлением линолевой кислоты. Согласно нашей гипотезе, чем больше ненасыщенность внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах, тем ниже точка фазового перехода липидов в процессе охлаждения и тем выше эффективность их криоконсервации. В дальнейшем мы планируем проверить нашу гипотезу и сопоставить увеличение степени ненасыщенности жирных кислот в преимплантационных эмбрионах различных видов млекопитающих с результатами их криоконсервации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Okotrub K.A., Amstislavsky S.Ya., Surovtsev N.V. // Arch Biochem Biophys. 2017 Vol. 635. P. 37–43.
2. Okotrub K.A., Mokrousova V.I., Amstislavsky S.Ya., Surovtsev N.V. // Biophys J. 2018 Vol. 115. P. 577–587.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-016-00025).

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

**А.Е. Панич¹, А.А. Панич², С.Н. Свирская², А.Ю. Малыхин², А.В. Скрылёв¹,
Е.С. Алексюнин¹, Е.А. Панич²**

¹Институт высоких технологий и пьезотехники ЮФУ, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Мильчакова, 10

²НКТБ «Пьезоприбор» ЮФУ, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Мильчакова, 10
E-mail: piezo@srfedu.ru; malyhin@srfedu.ru

Технологии диагностики, лечения и исследования различных заболеваний развиваются стремительными темпами. Тесное сотрудничество инженерных и естественных наук позволяет решать

такие задачи, которые десятилетия назад казались невыполнимыми. Широкое применение в медицине нашли пьезокерамические преобразователи. Пьезокерамика представляет собой искусственный материал, обладающий сегнетоэлектрическими свойствами и имеющий поликристаллическую структуру. Под действием механических напряжений в элементах, изготовленных из пьезоматериала, возникает поляризация и как следствие – электрическое поле. Это явление называется прямым пьезоэлектрическим эффектом. Существует также и обратный пьезоэффект – когда под действием электрического поля пьезоэлемент начинает деформироваться. На основе прямого и обратного пьезоэффекта создаются устройства и приборы биомедицинского применения:

В НКТБ «Пьезоприбор» производится спектр сегнето-пьезоматериалов, которые предлагается использовать для этих устройств. Новейшие разработки позволили создать сегнето-пьезоматериалы, превосходящие по своим механическим и электрофизическим характеристикам зарубежные аналоги. В зависимости от электрофизических характеристик, сегнето-пьезоматериалы делятся на сегнетожесткие и сегнетомягкие.

Сегнетожесткие материалы используются для создания фазированных антенных решёток, устройств фокусированного ультразвука, пьезофорсунок и других устройств силового ультразвука. В последнее время наиболее широко распространенным применением сегнетожестких пьезоматериалов стала область медицинской акустики, использующая фокусированный ультразвук высокой интенсивности (HIFU – High Intensive Focused Ultrasound). Основным механизмом воздействия HIFU является тепловой. Он обусловлен поглощением ультразвуковой энергии в тканях организма и её превращением в тепло. При распространении плоских ультразвуковых волн в среде интенсивность I ультразвука уменьшается с расстоянием следующим образом:

$$I = I_0 e^{-2ax}, \text{ где}$$

- I_0 – начальная интенсивность ультразвука;
- a – коэффициент затухания ультразвука в среде;
- x – расстояние до источника;

Аппаратная реализация данного метода представлена на рисунке 1:

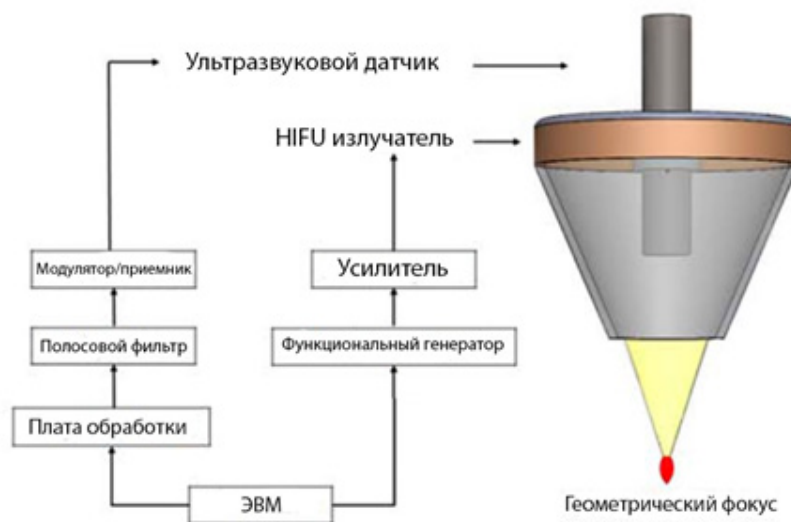


Рис. 1. Аппаратная реализация метода фокусированного ультразвука высокой интенсивности

Для создания излучателя необходимой мощности были сформулированы требования к пьезокерамическому материалу, и на основе этих требований разработан материал ПКП-35, обладающий высоким значением механической добротности, диэлектрической проницаемости коэффициента электромеханической связи в сочетании с низкими значениями тангенса угла диэлектрических

потерь и высокой температурной стабильностью. Из данного материала были изготовлены различные конфигурации пьезоэлектрических элементов в форме круглых дисков диаметром 25 мм, квадратных пластин с длиной стороны 25 мм и в форме сегмента сферы диаметром 50 мм. (рис. 2)

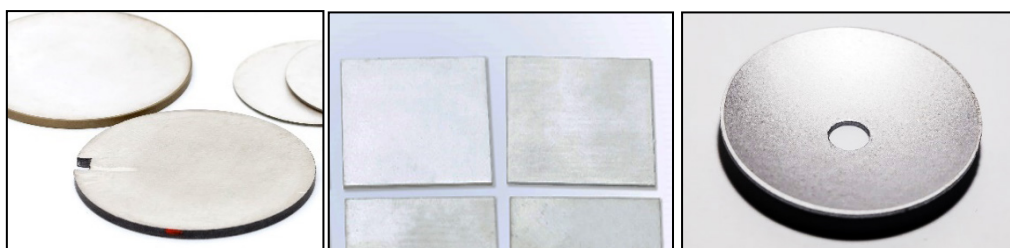


Рис. 2. Пьезокерамические элементы в форме диска, пластины и сегмента сферы, изготовленные из материала ПКП-35

Наилучшие результаты показал преобразователь в форме сферы. Помимо HIFU-преобразователей, описанный материал хорошо выполняет задачи диспергации жидкостей, применяемые в ультразвуковых небулайзерах и ингаляторах. Преобразователи, изготовленные из данного материала, используются в качестве излучателей в физиотерапии и косметологии как средства доставки активных веществ к тканям путём ультразвукового воздействия малой интенсивности.

Используя современные пьезокерамические материалы в НКТБ «Пьезоприбор» были проведены исследования по разработке ультразвуковых форсунок для медицинских целей. В целом устройства подобного типа состоят из ряда частей. В состав входит рабочий орган, выполненный в виде трансформатора скорости, т. е. концентратора механических колебаний с центральным отверстием, для поступления жидкости, преобразователя колебаний и генератора. При подключении переменного напряжения на преобразователь колебаний, которым является пьезокерамический элемент, последний начинает вибрировать, создавая в противоположном конце рабочего органа колебания ультразвуковой частоты. Используя данную схему построения, удалось получить размеры частиц аэрозоля не более 10 мкм за счет повышения рабочих частот генератора аэрозоля до 300 кГц.

Сегнетомягкие материалы, выпускаемые в НКТБ «Пьезоприбор» обладают высокими значениями пьезомодулей и диэлектрической проницаемости, что делает их незаменимыми в системах сбора и генерации энергии, прецизионных актюаторах, биморфах и т.д. В качестве практического применения хорошо зарекомендовал себя материал ПКП-12, обладающий высокими значениями электрофизических параметров. Одним из его применений является система сбора энергии, которая позволяет генерировать энергию до 9,5 мВт, достаточную для питания миниатюрных электронных устройств во время ходьбы или бега. Характеристики пьезокерамических материалов, выпускаемых в НКТБ «Пьезоприбор», в том числе приведённых в статье, даны в таблице.

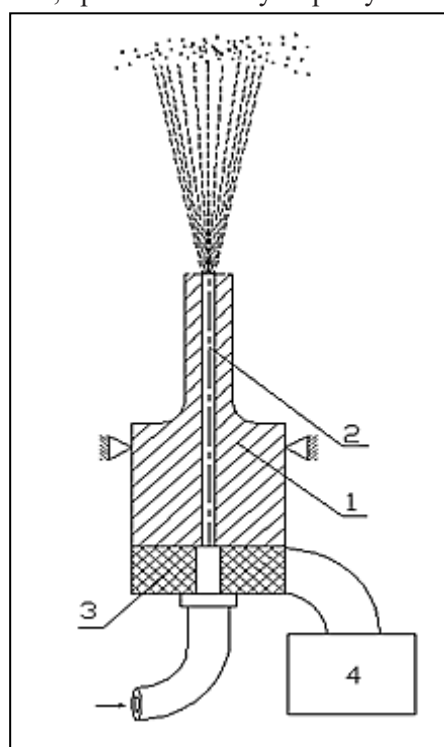


Рис. 3 Ультразвуковой распылитель жидкости:

- 1 – концентратор механических колебаний;
- 2 – центральное отверстие для подачи жидкости;
- 3 – пьезокерамический преобразователь колебаний;
- 4 – генератор.

Характеристики пьезокерамических материалов НКТЬ «Пьезоприбор» ЮФУ

Название материала	$\epsilon_{33}^T / \epsilon_0$	tg δ , не более	K_p не менее	Q_m	$d_{31} \cdot 10^{-12}$ Кл/Н	$d_{33} \cdot 10^{-12}$ Кл/Н	T_c °С
<i>Материалы сегнетомягкие</i>							
ЦТС-19	1620-1980	0,010	0,50	50-120	150-200	310-460	290
ЦТС-21	429-600	0,018	0,27	100-200	30-60	75-120	400
ПКП-11	2700-3000	0,025	0,55	60-80	220-250	600-650	180
ЦТСНВ-1	1840-2450	0,020	0,52	70-120	165-260	400-540	240
ПКП-12	3500-4500	0,030	0,55	60-100	270-330	700-800	180
ЦТС-83	1600-1800	0,025	0,50	50-70	110-130	350-370	320
ЦТС-83Г	1300±100	0,025	0,50	50-70	100-120	300-320	360
<i>Материалы средней жёсткости и сегнетожесткие материалы</i>							
ЦТБС-3	2300	0,012	0,45	350	135-200	360-400	180
ПКП-31	900-1100	0,003	0,58	2000	130-180	200-220	325
ПКП-33	1100-1600	0,003	0,60	450-1000	130-200	300-420	280
ПКП-35	1150-1350	0,005	0,58	750-850	140-150	330-340	280
<i>Бессвинцовые материалы</i>							
ТБ-1	1300-1900	0,020	0,20	100	45-70	100-150	110
ТБК-3	1000-1400	0,020	0,20	300	43-75	80-160	95
<i>Материалы с высокой чувствительностью по напряжению</i>							
ЦТС-36	650-800	0,020	0,58	60-80	90-150	290-380	350
ПКП-13	1100-1300	0,025	0,50	50-100	150-200	350-450	290

Существующий в НКТЬ «Пьезоприбор» ЮФУ научно-технический задел в области передовых пьезотехнологий позволил сформулировать предложения для включения в программу развития и совершенствования медицинского приборостроения в РФ:

1. Проведение НИОКР по созданию современной элементной базы медицинского приборостроения на основе высокоэффективных сегнето-пьезоэлектрических материалов, тонких сегнетоэлектрических пленок, композиционных пьезоструктур. Организация серийного производства, в том числе, с целью импортозамещения.

2. Разработка перспективных датчиков и преобразователей для медицинской техники различного назначения на основе разработанной элементной базы. Организация их серийного выпуска, в том числе, с целью импортозамещения.

3. Разработка и серийный выпуск пьезоэлектрических исполнительных механизмов микропозиционирования для систем навигации медицинской аппаратуры.

4. Разработка и организация серийного производства УЗ фокусирующих систем высокой интенсивности для использования в медицинской аппаратуре и приборах.

5. Проведение НИОКР с организацией серийного производства УЗ форсунок и распылителей (в том числе, с целью импортозамещения) для фармацевтического производства и медицинского приборостроения. В частности, для:

- УЗ устройств доставки пульмональных лекарственных средств;
- УЗ ингаляторов всех типов;
- устройств холодной аэрозольной стерилизации;
- аппаратов для аэрозольного лечения ран;
- устройств нанесения на нити для сшивания ран цианакрилатных клеев;

- устройств микрокапсулирования активных фармацевтических ингредиентов;
- устройств сушки ингредиентов распылением;
- УЗ распылителей коагулянтов на внутренние стенки устройств для взятия крови.

6. Проведение НИОКР и организация серийного производства безвредной УЗ аппаратуры для диагностики состояния плода на основе сверхширокополосных ультразвуковых сигналов с пониженной до безопасного уровня мощностью акустического сигнала.

7. Разработка и изготовление действующего образца компактной переносной автоматизированной УЗ аппаратуры для оперативной диагностики и терапии тромбоза сосудов головного мозга и каротидных артерий. Организация серийного производства аппаратуры.

8. Проведение НИОКР по совершенствованию ультразвуковых методов HIFU-терапии на основе использования фазированных антенных решеток. Создание действующего образца прибора HIFU-терапии с целью повышения эффективности метода и снижения себестоимости производства.

9. Проведение НИОКР по созданию образца высокоэффективного автоматизированного лечебного комплекса для УЗ гипертермии широкого спектра злокачественных опухолей различной медицинской локализации.

10. Проведение ОКР и организация серийного производства аппарата для фоноэлектрофореза ЛОР органов с использованием низкочастотного ультразвука на основе современной элементной базы и передовых конструкторских решений.

11. Проведение ОКР по созданию и организации серийного производства аппарата для ультразвуковой хирургии при неотложных состояниях ЛОР органов на основе разработанной перспективной элементной базы.

12. Проведение НИОКР по созданию серийного производства ультразвуковых фазированных антенных решеток с частотой до 10 МГц и выше для медицинского приборостроения.

МОЛЕКУЛЫ-АНТИОКСИДАНТЫ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА: МОЧЕВАЯ КИСЛОТА И КАТЕХОЛАМИНЫ

***И.Г. Панова¹, М.Д. Чибирева¹, Ю.В. Сухова², А.С. Татиколов³,
Р.А. Полтавцева², Т.Ю. Иванец²***

¹*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова 26*

²*Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Академика Опарина, 4*

³*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: pinag@mail.ru

Мочевая кислота и катехоламины – малые биомолекулы, которые играют важную роль в метаболизме различных органов и организма в целом. Мочевая кислота – конечный продукт пуринового метаболизма у человека и некоторых высших приматов. Она является сильным тушителем синглетного кислорода, регулятором окислительного стресса, компонентом сыворотки крови, присутствует в жидких средах и тканях организма и способна предохранять их от разрушений, вызываемых свободными радикалами кислорода. Помимо антиоксидантной функции мочевая кислота служит показателем ряда патологических состояний в организме. Мочевая кислота является одним из главных эндогенных сигналов опасности при повреждении клеток, приводящем к стимуляции иммунной системы путем активации Т-клеток. Катехоламины являются нейротрансмиттерами, широко

распределены в организме и играют важную роль в центральной нервной системе. Взаимодействие между нейротрансмиттером и рецептором – один из главных путей коммуникации нейронов. Характер распределения мочевой кислоты в мозге соответствует распределению в нем катехоламинов. Показана взаимная связь обмена мочевой кислоты в ЦНС с обменом катехоламинов. Установлено также, что и мочевая кислота, и катехоламины ингибируют перекисное окисление липидов. Из многочисленных функций мочевой кислоты и катехоламинов мы сделали акцент на их антиоксидантных свойствах, поскольку антиоксидантная защита является важной составляющей в развитии глаза.

В пренатальном развитии человека глазу требуются специальные условия для его развития в полноценный орган зрения. Одним из механизмов для корректировки развития глаза является система антиоксидантной защиты. Дисбаланс между продукцией и деградацией свободных радикалов приводит к окислительному стрессу, при этом сверхэкспрессия свободных радикалов является повреждающим фактором для клеток, приводящим к нарушению процессов пролиферации, повреждению липидов, белков, нуклеиновых кислот и т. д.). Во время эмбрионального и плодного развития ткани глаза особенно нуждаются в антиоксидантной защите, прежде всего сетчатка и хрусталик, имеющие высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в составе клеточных мембран, а близость к ним кровеносных сосудов (гиалоидные сосуды стекловидного тела в процессе роста и регрессии, сосуды хрусталиковой сумки вокруг развивающегося хрусталика, хориокапилляры сосудистой оболочки, развивающиеся сосуды собственно сетчатки) создаёт опасность повреждения тканей, вызываемого окислительным стрессом.

Стекловидное тело (СТ) представляет собой самый объёмный внеклеточный матрикс глаза человека, расположенный между сетчаткой и хрусталиком, и является важной внутриглазной средой (межклеточным матриксом), обеспечивающей метаболические процессы между сетчаткой и хрусталиком, как во взрослом глазу, так и в пренатальном развитии. Ранее нами было показано, что в пренатальном развитии человека в СТ присутствует лютеин, альбумин и альфа-фетопротейн – молекулы, обладающие свойствами антиоксидантов. В СТ в раннем пренатальном развитии человека мочевую кислоту и катехоламины не определяли.

Таким образом, цель настоящей работы – проанализировать в СТ глаза плодов человека присутствие мочевой кислоты и катехоламинов.

Измерение мочевой кислоты проводили с 17-й по 31-ю неделю в супернатантах СТ, полученных после центрифугирования СТ (12500 об/мин, eppendorf centrifuge 5417R, 4°C, 30 мин) на автоматическом биохимическом анализаторе ВА-400 компании «BioSystems S.A.» (Испания). Катехоламины (норадреналин, адреналин, дофамин) и их предшественника – аминокислоту ДОФА определяли в СТ у 17 и 18-недельных плодов методом ВЭЖХ.

Мочевая кислота была обнаружена в СТ на всех исследованных стадиях. Из таблицы видно, что нет закономерной зависимости концентрации мочевой кислоты от возраста плодов в исследованный период. Возможно, это связано не только с особенностями пуринового метаболизма, но и с различиями в питании матери во время беременности.

Таблица

Концентрация мочевой кислоты в стекловидном теле глаза плодов человека в пренатальном развитии,

Возраст плодов, недели	17	19	22	23	24	31
Мочевая кислота, мкмоль/л	37–136	79–235	67–104	64	142–248	79–80
Для сравнения: пределы концентрации мочевой кислоты в крови у детей до 12 лет – 120–220 мкмоль/л, у взрослых женщин – 150–350 мкмоль/л, у взрослых мужчин – 210–420 мкмоль/л.						

В СТ на стадиях 17 и 18 недель были обнаружены катехоламины – норадреналин, адреналин, дофамин и их предшественник ДОФА, источником которых может являться сетчатка, а также

поступление этих веществ через кровеносные сосуды сетчатки, сосуды гиалоидной системы, цилиарного тела и радужки.

Полученные данные позволили расширить наше представление о молекулах, находящихся в стекловидном теле в период пренатального развития, которые обладают антиоксидантными свойствами. Эти молекулы обеспечивают защиту сетчатки, хрусталика и СТ от окислительного стресса, а также, будучи сигнальными молекулами, могут участвовать в регуляции пролиферации и дифференцировки сетчатки и хрусталика.

Работа проведена в рамках Госзадания № 0108-2019-0005 (ИБР РАН) и № 001201253314 (ИБХФ РАН).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

А.Ю. Паритов, З.И. Боготова, М.М. Биттуева, Т.Х. Хандохов

Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, 360000, Российская Федерация, г. Нальчик, ул. Чернышевского, 173

E-mail: Paritov@mail.ru

Сахарный диабет I типа (СД1) – это заболевание эндокринной системы, связанное с хроническим повышением уровня глюкозы в крови. Абсолютная недостаточность секреции инсулина сопровождается различными расстройствами. На сегодняшний день есть много вопросов, связанных с этиологией и патогенезом СД1. Явным остается лишь тот факт, что в последние десятилетия наблюдается увеличение распространения данного заболевания.

СД1 относится к многофакторным полигенным заболеваниям, в которых развитие патологии вызвано сложным взаимодействием генетических и средовых факторов. В связи с этим поиск генов, предрасполагающих к СД1, важен в плане раскрытия механизмов развития заболевания и для разработки ранней доклинической диагностики, профилактики заболевания и медико-генетического консультирования.

В связи с тем, что молекулярно-генетические исследования СД1 проведены на ограниченном числе популяций разных народов мира, в том числе проживающих в России, представляется необходимым проведение ряда исследований, направленных на выявление аллелей, предрасполагающих к СД1, в различных этнических группах. Исследования по изучению распространения генов-кандидатов СД1 в популяциях этнических групп, проживающих на территории КБР, ранее никогда не проводилась.

Основной целью данных исследований явилось изучение роли полиморфизма гена *DRB1* в формировании наследственной предрасположенности к СД1. В ходе исследования проведён анализ заболеваемости СД1 в КБР и ассоциаций аллельных вариантов гена *DRB1* с СД1 в популяционных выборках КБР.

В Кабардино-Балкарии с 2015 по 2017 гг. не отмечено значительного роста общих случаев заболеваемости СД1 с 2016 по 2017 гг., что, вероятно, связано с увеличением количества случаев смерти от СД1 и его осложнений. Выявлен прирост больных на 404 человека с 2015 по 2016 гг., но за последние три года отмечен рост заболеваемости СД1 на 9,7 %. Также наблюдается увеличение частоты случаев СД1 у детей и подростков на 8,6 %.

Проведено изучение аллельных вариантов гена *DRB1* у 184 неродственных индивидов, проживающих на территории Кабардино-Балкарской Республики. Обследовано 84 пациента с диагнозом СД1 в возрасте 14–69 лет. В контрольную группу вошли 100 практически здоровых индивидов в возрасте 16–57 лет, неродственных между собой, без клинических симптомов СД1 и наследственной отягощённости по изучаемому заболеванию. Выборка больных с СД1 включала 42 балкарца (22

мужчины и 20 женщин) и 42 кабардинца (20 мужчин и 22 женщины). Контрольная группа состояла из 46 кабардинцев (22 мужчины и 24 женщины), 54 балкарцев (26 мужчин и 28 женщин).

Для гена *DRB1* характерно существование 14 типов специфичностей – *DRB1*01*, *DRB1*04*, *DRB1*07*, *DRB1*08*, *DRB1*09*, *DRB1*10*, *DRB1*11*, *DRB1*12*, *DRB1*13*, *DRB1*14*, *DRB1*15*, *DRB1*16*, *DRB1*17*, *DRB1*18*.

Проведенный анализ ассоциаций аллельных вариантов гена *DRB1* показал, что у больных СД1, кабардинцев по этнической принадлежности, в большем числе случаев, чем у здоровых лиц той же этнической принадлежности, обнаруживаются аллели *DRB1*04* (32,1 и 10,5 %, соответственно, $p < 0,001$), а также *DRB1*17* (23,2 и 5,6 %, соответственно, $p=0,001$). В то же время, у больных СД1, по сравнению с здоровыми индивидуумами той же этнической группы, выявлены в меньшем числе случаев специфичности *DRB1*11*, чем в контрольной группе (2,9 и 12,4 %, соответственно, $p=0,012$), *DRB1*13* (5,7 и 15,8 %, соответственно, $p=0,029$), *DRB1*15* (0,0 и 12,0 %, соответственно, $p=0,001$). Также намечается тенденция уменьшения частоты варианта специфичности *DRB1*12* в группе больных СД1 (0,9 % и 4,9, соответственно, $p=0,055$).

Проведённый анализ ассоциаций аллельных вариантов гена *DRB1* показал, что у больных СД1, балкарской этнической принадлежности, в большем числе случаев, чем у здоровых лиц той же этнической принадлежности, также обнаруживаются аллели *DRB1*04* (32,7 и 11,5%, соответственно, $p < 0,001$), *DRB1*17* (22,1 и 5,7 %, соответственно, $p=0,001$).

Также у больных СД1 по сравнению со здоровыми индивидами той же этнической группы выявлены в меньшем числе случаев специфичности *DRB1*11*, чем в контрольной группе (2,8 и 11,4 %, соответственно, $p=0,017$); *DRB1*13* (5,7 и 14,8 %, соответственно, $p=0,023$), *DRB1*15* (0,4 и 14,5 %, соответственно, $p=0,001$).

Таким образом, анализ специфичностей гена *DRB1* в двух этнических группах, проживающих в КБР показал, что между группами больных с СД1 и здоровыми лицами контрольной группы отмечаются различия по распределению частот специфичностей этого гена.

АНТИМУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОДУКЦИИ РАСТЕНИЕВОДСТВА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТАМИ

В.М. Пахомова¹, А.И. Даминова¹, И.А. Гайсин²

¹Казанский государственный аграрный университет, 420011, Российская Федерация, г. Казань, ул. Ферма-2, 53

²Академия наук Республики Татарстан, 420013, Российская Федерация, г. Казань, ул. Баумана, 20
E-mail: pahomovav@mail.ru; danis14@mail.ru

Исследовали антимуутагенное действие диализатов плодов томата, огурца и ярового ячменя, полученных с применением полупроницаемой мембраны. Предпосевную обработку зёрен ячменя проводили в дозах 2, 4 и 6 л/т. Овощные культуры выращивали в тепличных условиях по малообъемной технологии с капельным поливом. Вегетирующие растения томата опрыскивали медь- и молибден-содержащим хелатным микроудобрением марки ЖУСС-2 (0,4 %). Растения обрабатывались дважды – в фазу цветения второго завитка и через две недели. Некорневую обработку растений огурца раствором ЖУСС-2 (0,05 %) проводили в фазу 18 листьев и через две недели. Антимутагенная активность оценивалась цитогенетическим методом по учёту хромосомных мутаций при их индуцировании этилметансульфонатом (ЭМС). Тест-объекты – семена *Allium cepa* L. и *Crepis capillaris* при использовании экстрактов зерна ячменя и овощей, соответственно. Установлено, что в клетках контрольных семян *Allium cepa* L. (без воздействия) наблюдается достаточно высокое значение спонтанных aberrаций. Обработка ЭМС приводила к его повышению в 6 раз. При последующей обработке семян тест-объекта экстрактами из зерна ячменя, выращенного из семян, обработанных хелатным микроудобрением в дозе 4 и 6 л/т, наблюдалось снижение мутаций в 2,5 и 5 раз, соответственно. Антимутагенный эффект экстрактов из

плодов томата и огурца, выращенных при некорневой обработке растений ЖУСС-2, составлял около 60 и 40 %, соответственно. Таким образом, продукция растениеводства является природным преветором, и её протекторные свойства могут быть повышены при разноплановом применении хелатных микроудобрений. Одна из причин последнего – их антиоксидантный эффект, установленный ранее в наших исследованиях. В злаковых культурах преветорами являются механические ткани, витамин Е, некоторые органические кислоты, Se. В овощных культурах преветорные свойства проявляют ряд витаминов, флавоноидные и фенольные соединения, фотосинтетические пигменты и др.

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКОЙ ФОРМЫ ВАНАДИЯ НА СТЕПЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ, ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ КРЫС-САМЦОВ ЛИНИИ ВИСТАР С ИНДУЦИРОВАННЫМИ НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Н.А. Петров, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова

*Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 109240, Российская Федерация, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14
E-mail: petrov-nikita-y@mail.ru; sidorovaulia28@mail.ru; mazo@ion.ru*

Выяснение физиологической роли так называемых условно-эссенциальных микроэлементов, среди которых особый интерес представляет переходный металл – ванадий (V), необходимо для уточнения качественного состава нутриома. Известно профилактическое и корригирующее влияние соединений V на нарушения углеводного и липидного обмена у млекопитающих. Однако терапевтически эффективные дозы V могут перекрываться дозами, оказывающими токсическое действие на организм. Токсичность соединений V зависит от их конкретной химической формы. Недостаточно исследовано влияние V на тревожность, память и двигательную активность млекопитающих.

Целью данного исследования являлась оценка влияния комплекса V с ферментативным гидролизатом изолята соевого белка (ФГИСБ) на некоторые физиологические показатели и углеводный обмен у крыс-самцов линии Вистар, получавших высокожировую высокоуглеводный (ВЖВУ) рацион.

В эксперименте использованы 50 крыс-самцов линии Вистар, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая». До начала эксперимента у животных оценивали уровень глюкозы крови и рандомизированно (по массе тела и уровню глюкозы) разделили на пять групп: контрольную группу К1 ($n=10$); контрольную группу К2 ($n=10$) и три опытных группы Г3–Г5 ($n=10$). Животные группы К1 на протяжении всего эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион (ПСР, 25 % белка, 10 % жира); животные групп К2–Г5 получали ВЖВУ рацион, (25 % белка, 30 % жира, 20 % сахарозы). В рацион животных опытных групп Г3–Г5 дополнительно вносили комплекс V с ФГИСБ (V-ФГИСБ), в дозировках $(7,3\pm 0,7)$, $(72,5\pm 6,5)$ и (725 ± 65) мг/кг корма. Комплекс был получен по схеме, описанной в [1], содержание V составило 15,8 мг/г комплекса. Три раза в неделю контролировали потребление корма, раз в неделю животных взвешивали. На протяжении эксперимента вели мониторинг уровня глюкозы крови животных. В тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) оценивали степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги, определяемую по отношению времени проведённого в открытых рукавах лабиринта (ОР) к времени в закрытых рукавах (ЗР) – коэффициент ОР/ЗР – и двигательную активность. Тестирование проводили на 85-й и 86-й день эксперимента. Оценку поведения и памяти животных проводили, используя тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ). По окончании исследования (на 100-е сутки) животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом.

У животных опытных групп, получавших V-ФГИСБ, отмечено значительное снижение потребления корма и снижение прироста массы тела по сравнению с обеими контрольными группами.

Потребление животными V в сутки составило (в расчёте на кг массы тела): для животных группы Г3 – 5,1±0,3 мг/кг; группы Г4 – 48,6±3,4 мг/кг и группы Г5 – 499,5±27 мг/кг.

Таблица

Результаты теста ПКЛ

Показатель	Группа животных				
	К1	К2	Г3	Г4	Г5
ОР/ЗР	61,9±14,2	20,4±5,2*	24,7±6,3*	30,7±15,7	37,3±17,2
Пройденная дистанция, см	1671±107	1638±186	820±123*#	1150±126*#	1188±138*#

Примечание: * – различия достоверны относительно К1 согласно критерию Стьюдента; # – различия достоверны относительно К2 согласно критерию Стьюдента

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют, что максимальной тревожностью отличались животные группы К2 и животные группы Г3, получавшие наименьшую дозу V. Животные всех опытных групп отличались меньшей двигательной активностью по сравнению с животными групп К1 и К2. Не выявлено достоверных отличий изменения как краткосрочной, так и долгосрочной памяти животных всех сравниваемых групп в тесте УРПИ. Содержание глюкозы в крови животных группы К1 (6,6±0,2 ммоль/л) и К2 (7,2±0,3 ммоль/л) на 98-е сутки достоверно между собой не отличалось. Уровень глюкозы в крови животных опытных групп Г3, Г4 и Г5 (5,7±0,4; 5,0±0,4; 5,4±0,2 ммоль/л, соответственно) снизился достоверно относительно обеих контрольных групп. Полученные результаты подтверждают гипогликемические эффекты соединений V. Однако существенное торможение роста животных, получавших ванадий в форме V-ФГИСБ, и снижение двигательной активности этих животных свидетельствует о его токсичности в интервале использованных доз. Соответственно для решения вопроса о дальнейших перспективах возможного использования V-ФГИСБ в диетотерапии необходимы дальнейшие исследования по оценке токсичности этого комплекса и нахождение приемлемого баланса между его гипогликемическими и проявляемыми побочными эффектами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зорин С.Н., Сидорова Ю.С., Лобанова Ю.Н., Мазо В.К. // Вопр. питания. 2019. Т. 88, № 1. С. 85–90. Doi: 10.24411/0042-8833-2019-10010.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение Программы научных исследований президиума РАН «Разработка формулы оптимального питания: обоснование состава нутриома и микробиома человека» на 2018-2020 гг. (тема № 0529-2018-0111).

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ У КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

М.Б. Саидов, Э.З. Эмирбеков

Дагестанский государственный университет, 367000, Российская Федерация, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43^а

E-mail: smagras@mail.ru

Целью исследования явилось выяснение закономерностей изменения перекисной резистентности эритроцитов крыс при искусственной гипотермии 30 °С разной продолжительности. Известно, что для начальных этапов гипотермии характерна активация свободно-радикальных процессов, существенно модифицирующая биологические мембраны.

Эксперименты были проведены на беспородных белых крысах, содержащихся в условиях вивария. Гипотермию у животных вызывали с помощью специальных холодových камер. Температуру тела, измеренную ректально, снижали до 30 °С (умеренная гипотермия). Для моделирования умеренной пролонгированной гипотермии температуру тела животного поддерживали на уровне 30 °С в течении 30, 60 и 180 мин, измеряя её через каждые 10 мин. Кровь после декапитации животного собирали в стеклянные пробирки с гепарином, а затем центрифугировали для получения эритроцитов. Суспензию эритроцитов инкубировали на воздухе при постоянном перемешивании в отсутствие или присутствии прооксидантов. О степени гемолиза судили по выходу в среду инкубации гемоглобина.

При гипотермии 30 °С наблюдается возрастание гемолиза, индуцированного всеми системами: спонтанный – на 8 %; индуцированный H_2O_2 – на 44; индуцированный Fe^{2+} -аскорбат – на 50 %. При пролонгировании умеренной гипотермии 30 °С в течении 30 мин уровень спонтанного гемолиза остается выше на 1 %, гемолиза, индуцированного H_2O_2 , – на 53 %, гемолиза, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат, – на 55 % по отношению к контрольным значениям. Таким образом, гипотермия 30 °С и её пролонгирование в течение 30 мин способствуют таким изменениям в мембранах эритроцитов, которые делают их более доступными для протекания в них реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ)- и белков. Пролонгирование умеренной гипотермии в течении 60 мин не влияет на уровень спонтанного гемолиза эритроцитов. Необходимо отметить, что уровень спонтанного гемолиза эритроцитов при исследованных нами временных интервалах пролонгирования остаётся на постоянном уровне. В то же время гемолиз, индуцированный перекисью водорода при пролонгировании умеренной гипотермии в течении 60 мин по сравнению с контролем остаётся на достоверно высоком уровне. Однако при этом состоянии способность эритроцитов к гемолизу под действием перекиси водорода на 25 % снижается по сравнению с пролонгированием умеренной гипотермии в течении 30 мин. Уровень гемолиза, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат при пролонгировании умеренной гипотермии в течении 60 мин также находится на достоверно высоком уровне относительно интактного контроля, но на 18 % снижен относительно умеренной пролонгированной гипотермии продолжительностью 30 мин. Дальнейшее пролонгирование умеренной гипотермии до 3 ч существенно не меняет способность эритроцитов противостоять гемолизу, индуцированному перекисью водорода. Уровень гемолиза при этом сохраняется на уровне предыдущего этапа пролонгирования умеренной гипотермии. В то же время при пролонгированной 3-часовой умеренной гипотермии мы наблюдаем полную нормализацию уровня гемолиза, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат до контрольного уровня.

Таким образом, снижение перекисной резистентности эритроцитов мы наблюдаем на начальных этапах умеренной гипотермии и пролонгировании её в течении 30 мин. При дальнейшем пролонгировании умеренной гипотермии нами обнаружена тенденция к нормализации уровня гемолиза, индуцированного перекисью водорода и системой Fe^{2+} -аскорбат. По-видимому, снижение перекисной резистентности эритроцитов является следствием снижения обеспеченности мембран α -токоферолом и изменением упаковки липидного бислоя. Кроме того, активация свободно-радикальных процессов может привести к накоплению в мембранах полярных продуктов ПОЛ, свободных жирных кислот и лизолипидов. Последние обладают детергентоподобным действием и могут быть ответственны за нарушение упаковки липидного бислоя мембран эритроцитов при гипотермических состояниях. Сотрудниками нашей кафедры ранее показано, что интенсивность ПОЛ и окислительной модификации белков плазмы крови и мембран эритроцитов после кратковременной гипотермии (30 °С) возрастает, а после пролонгирования гипотермии в течение 3 часов снижается.

Известно, что осмотическая устойчивость эритроцитов зависит от отношения площади поверхности клетки к его объёму. В литературе имеются данные о том, что при гипотермии происходит снижение доли эритроцитов с дисковидной формой и увеличение доли трансформированных форм клеток. Эритроциты с трансформированной мембраной обладают наименьшей осмотической стойкостью. Эти результаты позволяют предположить, что при умеренной (30 °С) гипотермии и её пролонгировании в течение 30 мин возможно происходит трансформация дискоцитов в изменённые формы, обладающие низкой перекисной устойчивостью. Снижение перекисной резистентности эритроцитов при исследованных нами экспериментальных состояниях может быть также связано с окислительными изменениями белков мембран эритроцитов. Сотрудниками нашей кафедры было

показано, что сразу после снижения температуры тела количество белка в мембранах эритроцитов (белок полосы 3) достоверно снижается. Автор полагает, что достоверное снижение белка полосы 3 может быть связано с окислительной модификацией и последующей деградацией их при умеренной гипотермии под действием мембраносвязанных протеиназ эритроцитов. Таким образом, снижение перекисной резистентности эритроцитов, обнаруженное нами при умеренной (30 °С) гипотермии и её пролонгировании в течение 30 мин, по-видимому, является следствием интенсификации окислительных процессов липидов и белков мембран эритроцитов.

РАСЧЁТНЫЙ ПРОГНОЗ ЭКОТОКСИЧНОСТИ ИОННОЙ ЖИДКОСТИ НА ОСНОВЕ ГИПОФОСФИТА ИМИДАЗОЛИЯ

Н.М. Седых^{1,2}

¹*Иркутский государственный университет, 664003, Российская Федерация, г. Иркутск, б. Гагарина, 20*

²*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, 664033, Российская Федерация, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1*

E-mail: googo@mail.ru

Ионные жидкости все более широко используются в самых разнообразных областях науки и техники. В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН разработаны и успешно развиваются подходы к направленному синтезу новых функциональных фосфорорганических соединений непосредственно из элементного фосфора (реакция Трофимова-Гусаровой) (см., например, [1]), в том числе, с использованием явления дефектообразования в твердой структуре этого химического элемента [2–4]. Недавно получены не известные ранее гипофосфиты 1-Н-, 1-алкил-, и 1-винил-3Н-имидазолия, являющиеся ионными жидкостями при комнатной температуре. Целью работы явилось расчетное прогнозирование экологической токсичности этих новых фосфорсодержащих ионных жидкостей.

Расчеты проводили с использованием модели “quantitative structure–activity relationships (QSARs)” для оценки физико-химических и эколого-токсикологических свойств новых ионных жидкостей.

Модель демонстрирует метод группового вклада, который рассматривает три основные группы дескрипторов в структуре ионной жидкости: анион, катион и замещения (углеродные цепи, связанные с катионом). Основываясь на этих дескрипторах, их вклад в экотоксичность ионной жидкости был оценен с помощью мультилинейной регрессионной модели.

Полученные результаты с использованием модели QSARs для оценки экологической токсичности новых ионных жидкостей вполне коррелируют с литературными данными для подобных соединений [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abakumov G.A. et al. // Russ. Chem. Rev. 2018. Vol. 87 (5). P. 393–507.*
2. *Gusarova N.K. et al. // Chem. Heterocycl. Comp. 2001. Vol. 37 (5): P. 576–580.*
3. *Sukhov B.G. et al. // Arkivoc. 2003. Vol. 13. P. 196–204.*
4. *Trofimov B.A. et al. // Catalysis in Industry. 2006. № 4. P. 18–23.*
5. *Luis P. et al. // J. Mol. Liquids. 2010. Vol. 152. P. 28–33.*

АНАЛИЗ АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА STXBP1 В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ C-DAG

В.А. Синюкова^{1,2}, А.В. Чиринская³, М.Е. Велижанина^{2,3}, Т.А. Белашова¹, Ю.В. Сопова^{1,3}, С.П. Задорский^{1,3}, А.П. Галкин^{1,3}

¹*Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 198504, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Петергоф, Ботаническая 17*

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, 196608, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, 3

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

E-mail: veleenna@yandex.ru

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счёт образования упорядоченных межмолекулярных β -складчатых листов. Несмотря на разницу в аминокислотной последовательности амилоидогенных белков, все они формируют фибриллы, сходные по структурным характеристикам. Амилоидные агрегаты не растворяются ионными детергентами (такими, как SDS) при комнатной температуре, связываются с амилоид-специфическими красителями: тиофлавином Т и S, а также конго красным. Связывание амилоида с конго красным вызывает двойную рефракцию в поляризованном свете. Традиционно в литературе рассматриваются преимущественно патологические амилоиды, ассоциированные с десятками неизлечимых заболеваний человека. Однако со временем были выявлены амилоиды, в норме присутствующие в клетках широкого спектра живых организмов и выполняющие жизненно важные функции – от образования биопленки бактерий до участия в синтезе меланина у млекопитающих и человека.

В нашей лаборатории был разработан и успешно апробирован универсальный метод протеомного скрининга амилоидов (PSIA-LC-MALDI), основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам и позволяющий выявить белки, формирующие SDS-устойчивые агрегаты в исследуемом образце [1]. С помощью данного метода нами был проведён поиск белков – кандидатов на роль функциональных амилоидов в мозге крысы *Rattus norvegicus*. Одним из белков, выявленных в результате протеомного скрининга, является STXBP1 (Syntaxin-binding protein) – синтаксин-связывающий белок, локализующийся в цитоплазме около плазматической мембраны. STXBP1 входит в комплекс белков, обеспечивающих слияние мембран при экзоцитозе, а также участвует в процессе секреции нейромедиаторов.

Белок является жизненно важным, даже снижение уровня экспрессии гена STXBP1 может приводить к развитию различных заболеваний, а некоторые миссенс мутации могут приводить к ранней младенческой эпилептической энцефалопатии (Early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst, EIEE), также известной как синдром Охтаха. Мы подтвердили данные протеомного скрининга методами PAGE и SDD-AGE с последующим Вестерн-блоттингом, показав, что в мозге крыс *Rattus norvegicus* белок STXBP1 присутствует во фракции высокомолекулярных детергент-устойчивых агрегатов. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности белка STXBP1 с использованием алгоритма ArchCandy показал наличие трёх потенциально амилоидогенных регионов в С-терминальной части белка. Дальнейший анализ амилоидных свойств белка проводился в бактериальной системе для продукции экстраклеточных амилоидов C-DAG [2]. В данной системе нами были продуцированы две изоформы белка STXBP1, а также их С-терминальные фрагменты: STXBP1a (252–594 а.к.) и STXBP1b (252–603 а.к.). Во всех вариантах во внеклеточном пространстве были детектированы фибриллы с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Колонии бактерий, продуцировавших эти фрагменты на среде с конго красным, окрашивались в красный цвет и демонстрировали яблочно-зелёное свечение в поляризованном свете, что является типичной характеристикой амилоидов. Таким образом, полученные данные дают основания полагать, что белок STXBP способен к образованию амилоидных агрегатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nizhnikov A.A., Ryzhova T.A., Volkov K.V., Zadorsky S.P. et al. // PLoS Genetics. 2016. Vol. 12, № 12. P. 1–19.
2. Sivanathan V., Hochschild A. // Nat. Protoc. 2013. Vol. 8, № 7. P. 1381–1390.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-50-00069 и РФФИ мол_а №18-34-00419, ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.

АНАЛИЗ ПРОГРАММ ВРТ У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ГЕПАТИТОВ В И/ИЛИ С

*К.Ю. Сагамонова¹, С.В. Ломтева¹, Т.П. Шкурат², Е.С. Бугримова¹, О.С. Золотых¹,
А.А. Клепикова¹, Т.А. Казанцева¹, А.Н. Шестель¹, И.Б. Крутящая³, И.Б. Кучеренко³*

¹Центр репродукции человека и ЭКО, 344068, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, 90А

²Южный научный центр Российской академии наук, 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

³ООО «Лабораторные технологии», 346735, Ростовская обл., пос. Верхнетемерницкий, ул. Обсерваторная, 38

E-mail: embryolab61@gmail.com

Печень – это главный орган, отвечающий за процесс детоксикации ксенобиотиков, что в условиях нарушения её работы, вызванной инфекциями гепатита В, С, приводит к накоплению патологических метаболитов и, в свою очередь, может обуславливать снижение качества ооцита и, как следствие, эмбриона.

Целью исследования являлось изучение особенности функционирования репродуктивной системы, качества гамет, эмбрионов, частоту наступления беременности и процент имплантации у женщин с бесплодием и хроническими формами гепатита В и/или С.

В исследование были включены пациентки, проходившие лечение с использованием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В первую группу были включены 33 женщины, имеющие в анамнезе хроническую форму гепатита В и/или С, во вторую группу – 47 женщин с бесплодием, но без носительства HBV и/или HCV (контроль). Все пациентки были в репродуктивном возрасте (от 26 до 39 лет), с первичным и вторичным бесплодием (длительность бесплодия от 2 до 14 лет), с сохранённым овариальным резервом. На момент вступления в программу основные биохимические показатели функционирования печени (АЛТ, АСТ) были в пределах референтных значений по исследуемым показателям в обеих группах. В таблице представлены результаты клинико-лабораторных и эмбриологических показателей.

Таблица

Физиологические, клинико-лабораторные и эмбриологические показатели у женщин с бесплодием и хроническим гепатитом В и/или С

Показатели	Возраст, лет	АМГ, мЕД/мл	ФСГ, мЕД/мл	Количество полученных ооцитов	Количество зрелых ооцитов	% полученных гамет к зрелым ооцитам	% оплодотворения	% эмбрионов на стадии дробления на 3-и сутки от общего кол-ва зигот	Количество blastocist	% blastocist от количества зигот	Процент имплантации
С гепатитами В/С (33 чел.)	33,32± 0,8	2,28± 0,19	7,44± 0,46	7,59± 0,87	6,77± 0,8	90,09± 7,32	80,5± 6,9	89,91±8,72	2,05± 0,31	46,87± 9,60	17,6
Без гепатита (47 чел.)	32,91± 0,66	2,29± 0,21	6,56± 0,40	8,97± 0,91	7,12± 0,85	79,39± 6,88	83,7± 6,38	81,42±5,7	3,09± 0,68	56,88± 7,30	32
Уровень значимости <i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Как видно из таблицы, наличие хронических форм гепатита В и С у женщин репродуктивного возраста не влияет на количество полученных ооцитов, степень их зрелости и процент оплодотворения, но определяет количество образовавшихся на 5-е сутки blastocist и их имплантационный потенциал.

У женщин с хроническими гепатитами В и/или С наблюдалось уменьшение количества бластоцист на 5–6-е сутки культивирования в 1,5 раза и снижение процента имплантации на 14,4 %. Отмечена тенденция к снижению процента наступления беременности у группы женщин, имеющих хронические вирусные гепатиты в анамнезе.

При хроническом гепатите В и/или С у женщин снижение функциональности системы детоксикации может приводить к увеличению ксенобиотиков, которые в своё время могут оказывать существенное влияние на экспрессию генов в раннем эмбриогенезе, что и приводит к гибели эмбриона и уменьшению процесса имплантации бластоцист.

РАЗРАБОТКА ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МОЗГА

Л.Е. Сорокина¹, И.И. Фомочкина¹, В.И. Петренко¹, А.С. Кучеренко¹, С.С. Халилов²

¹Медицинская академия им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, 295051, Российская Федерация, г. Симферополь, бул. Ленина 5/7

²Физико-технический институт Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, 295007, Российская Федерация, г. Симферополь, пр. академика Вернадского 4,
E-mail: leya.sorokina@mail.ru; fomochkina_i@mail.ru; petrenko-vitalina@mail.ru; aleksandr-kucherenko@bk.ru; server.khalilov.94@mail.ru

Сегодня на пересечении молекулярной биологии и передовых лазерных технологий стремительно развивается новое междисциплинарное направление – оптогенетика, в рамках которой разрабатывается обширный арсенал для изучения механизмов формирования памяти и поведения, функциональной диагностики и терапии нейродегенеративных, психогенных патологий и других социально-значимых заболеваний человечества. Центральная роль в решении таких комплексных и сложных задач отводится знаниям о функционировании различных генетических конструкций и внедрению принципиально новых устройств нейрофотоники и лазерной нейроинженерии [1]. Такие системы открывают новые горизонты в исследовании работы электровозбудимых тканей, обеспечивая возможность долговременной регистрации ответа маркерных белков – опсинов, а также фотостимуляции различных областей нашего тела с высоким пространственным разрешением и минимальной степенью инвазивности.

Разработанные и внедрённые в практику последние достижения оптогенетики основаны на использовании генетически кодируемых светочувствительных ионных каналов, которые в последующем подвергаются воздействию различных комбинаций фотостимуляции.

Приведённый анализ рынков основных отраслей, где могут быть внедрены оптогенетические разработки, демонстрирует колоссальные возможности для роста не только научной сферы, но и практической медицины [2].

Цель данной работы – экспериментальное изучение эффектов оптогенетической стимуляции гиппокампа для разработки и внедрения дальнейших диагностических, терапевтических и профилактических мероприятий при различных социально значимых заболеваниях.

Исследование будет выполняться на базе Центра коллективного пользования «Молекулярная биология» и «Экспериментальная физиология и биофизика» Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Объекты исследования – трансгенные мыши линии Ai27(RCL-hChR2(H134R)/tdT)-D). В основной части эксперимента запланировано выполнение операции с целью внедрения оптоволоконного нейроинтерфейса в область гиппокампа. Для оценки полученных результатов будут применяться электрофизиологические, молекулярные, морфологические методы и когнитивные тесты.

Впервые экспериментально *in vivo* на свободно двигающихся трансгенных мышах планируется изучить активацию головного мозга с помощью оптогенетического подхода в эксперименте, оценить возможность улучшения синапсообразования и пластичности мозга. Исследование заключается в определении исходных параметров, проведении фотостимуляции на протяжении восьми недель

и определении параметров функционирования объектов исследования после основной части эксперимента. Во время реализации эксперимента будут использованы современные технологии стереотаксического внедрения оптоволоконного нейроинтерфейса в мозг животного, технологии изучения ультраструктурных изменений – морфологические исследования с помощью световой и электронной микроскопии, молекулярные исследования – изучение концентрации факторов роста головного мозга с помощью иммуноферментного анализа.

Разработанный в ходе работы оптимальный режим и способ оптогенетической стимуляции головного мозга поможет расширить возможности лечения пациентов с различными заболеваниями, в частности улучшить когнитивные способности. Описание функционального состояния головного мозга с помощью изучения нейронных синапсов и когнитивных тестов позволит более точно и полноценно раскрыть патогенез неврологических нарушений и возникающие на его фоне осложнения. Кроме того, изучение структур головного мозга, задействованных в ходе работы даст возможность для создания инновационных карт и моделей искусственных нейронных сетей, что также внесёт немалый вклад в появление Нейронета.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Deisseroth K., Feng G., Majewska A.K. et al.* // J. Neurosci. 2006. Vol. 26 (41). P. 10380–10386, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006.
2. *Kuner T., Augustine G.J.* // Neuron. 2000. Vol. 27 (3). P. 447–459, doi: 10.1016/S0896-6273(00)00056-8.

РЕГИСТРАЦИЯ МАРГАНЦЕВОЙ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ В ПЛОДАХ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

Н.А. Ткачев, В.А. Серезенков

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: nitkachev@yandex.ru*

Под влиянием стрессовых физических факторов природной среды (например, температуры, влажности, ультрафиолета засоленности почвы и т. д.) у растения *Juniperus communis* эволюционно сформировалась более высокая антиоксидантная активность, чем у других растений. Наличие таких антиоксидантных ферментов, как каталаза и супероксиддисмутаза (SOD), содержащих марганец (MnSOD), медь (CuSOD), цинк (ZnSOD), железо (FeSOD) и никель (NiSOD) в *J. communis*, обуславливает его потенциальное биомедицинское применение. Например, многие фармакологические эффекты *J. communis* включают противоопухолевые свойства, антиоксидантную, антигенотоксическую и противокариозную активность, а также влияние на сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания, которые также должны коррелировать со значительным снижением уровня холестерина в крови. Кроме выработки антиоксидантных ферментов защитой от окислительного стресса служит явление биоминерализации: превращение ионов железа (Fe^{2+} , Fe^{3+}) в маггемит (Fe_2O_3) и магнетит (Fe_3O_4), которые депонируются в тканях в форме суперпарамагнитных наночастиц (SPIONs). Для детекции этих свободнорадикальных и парамагнитных объектов в настоящей работе был использован новый подход: применение метода спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [1].

Регистрировали и анализировали сигналы ЭПР для чешуй и семян *J. communis* и их смеси, а также содержащих плоды препаратов «Нефровил» и «Имуностан» (пр-во «Рослина Карпат»). Сигнал марганца с g-фактором 2,01 и 6-компонентной сверхтонкой структурой наблюдается только в семенах; тогда как сигнал с $g=2,28$, соотношенный со SPIONs, и широкие сигналы с $g=2,58$ и $2,36$, соответствующие агрегатам железа – только в оболочках. Препараты, содержащие измельчённые плоды, показали аналогичную картину, причем в препарате «Нефровил» наблюдалось больше Mn-содержащих ферментов, а в препарате «Имуностан» больше SPIONs.

Полученные данные показывают перспективы биомедицинского применения препаратов *J. communis* в качестве антиоксиданта, иммуностимулятора и источника биодоступных микроэлементов. Также представляет интерес возможность использовать измерение парамагнитных форм Mn и депонирование железа в форме SPIONs как маркеров антиоксидантного ответа растений на стресс-факторы внешней среды в экологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khalilov R., Kavetsky T., Serezhenkov V. et al. // *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2018. Vol.3, № 3. P.167–175

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ, ЛЕЖАЩИХ В ОСНОВЕ УСПЕШНОГО И НЕ УСПЕШНОГО РЕШЕНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ ПРИМЕРОВ С ДРОБЯМИ

А.С. Фомина, К.Ю. Гануша

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: a_bogun@mail.ru; ganusha.kristina@yandex.ru*

В современных нейрофизиологических исследованиях немного работ, посвящённых особенностям решения математических задач с использованием дробей. Решение примеров с дробями сопровождается активацией билатеральных нижнетеменных и затылочно-височных областей, а также левой предсильвиевой области, что позволяет предположить общность нейронного представительства целых чисел и дробей.

Целью работы стало изучение специфики поведенческих характеристик и спектральных особенностей ЭЭГ при решении примеров на сложение и деление обыкновенных дробей в зависимости от успешности решения. Было обследовано 30 человек (средний возраст $21,4 \pm 0,8$ лет), праворуких. Методика исследования состояла из двух частей – «Сложение дробей» и «Деление дробей». Каждая часть включала тренировочный (5 заданий, актуализация алгоритма) и основной (30 заданий, выполнение алгоритма) блоки. Участники нажимали на кнопку манипулятора «мышь» при выполнении каждого этапа решения. ЭЭГ регистрировалась с использованием энцефалографа-анализатора «Энцефалан-131-03» по схеме 10-20 в 21 стандартном отведении. Предъявление стимулов проводилось в программной среде «Аудиовизуальный слайдер». Рассчитывались время и качество решения, число и длительность промежуточных операций, спектральная мощность четырех основных диапазонов ЭЭГ. Достоверность различий оценивалась с использованием многофакторного дисперсионного анализа ANOVA при уровне значимости $p \leq 0,05$.

В зависимости от индивидуального качества решения все участники были распределены на группы – успешные (процент правильно решенных примеров выше 65 %) и неуспешные (ниже 65 %). Анализ зависимости времени решения от количества операций показал, что при сложении при успешном решении она имеет куполообразный характер. Неправильные примеры решались в две операции, что предполагало остановку решения на определённом этапе. При делении у успешных участников происходил переход к линейной динамике и появлялось неправильное решение в различное количество операций, что связано с низкой субъективной сложностью задачи. Для неуспешных участников характерна линейная динамика независимо от задачи, блока и правильности решения. Следовательно, для успешных и неуспешных участников характерны разные стратегии актуализации алгоритма решения. У успешных участников актуализация и выполнение алгоритма на сложение характеризовалось при правильном решении его полной реализацией, а при неправильном – остановкой после выполнения второй операции. Выполнение алгоритма на деление характеризовалось полной реализацией независимо от правильности решения, что также могло быть связано с низкой

субъективной сложностью данной задачи. Для неуспешных участников характерно увеличение длительности решения с ростом числа операций.

По результатам анализа значений спектральной мощности основных диапазонов ЭЭГ была выявлена сходная картина активации при решении обеих задач: формировались диффузные центрально-теменно-затылочные фокусы дельта-диапазона, лобно-центральные фокусы тета-диапазона, а также затылочные фокусы альфа- и бета-диапазона. Это позволяет предполагать, что в основе решения примеров на сложение и деление обыкновенных дробей лежат сходные нейрофизиологические механизмы. Общим является активация сетей ментальной арифметики и рабочей памяти, а также взаимодействия сетей спокойного и активного бодрствования.

Для успешных участников характерна концентрация активности и поддержание единого уровня тета-диапазона, а также десинхронизация альфа-диапазона, что свидетельствовало об активации системы долговременной памяти и меньшей нагрузке на рабочую память. Можно предполагать, что успешное решение связано с большей активацией системы долговременной памяти и кортико-гиппокампальной системы.

Для неуспешных участников характерно увеличение мощности тета-диапазона, его смещение во фронтальные области и меньшая десинхронизация альфа-диапазона, что может свидетельствовать о большей вовлечённости системы рабочей памяти и активации лобно-теменной сети. Синхронизация в тета-частотах связана с вовлечением рабочей памяти, а сохранение фокуса альфа-диапазона – с реактивацией долговременной памяти и тормозным контролем со стороны фронтальных структур для сосредоточения внимания на задаче.

Таким образом, успешность решения примеров на сложение и деление обыкновенных дробей обусловлена различными психофизиологическими механизмами. Для успешного решения определяющим выступало количество операций, а для неуспешного – их длительность. Успешное решение обусловлено доминированием систем долговременной памяти, мощной активацией кортико-гиппокампальной системы и вовлечением фронто-таламической. Неуспешное решение характеризуется смещением в сторону доминирования систем рабочей памяти, активацией лобно-теменной сети, а также тормозным контролем со стороны фронто-таламических систем.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИКИ РЕШЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ ЗАДАЧ СТУДЕНТАМИ МУЗЫКАЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

А.С. Фомина, О.В. Куклис

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета,
344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: asfomina@sfnedu.ru*

В современной литературе слабо представлены данные, связанные со спецификой выполнения интеллектуальных задач у людей с музыкальным профилем образования. В качестве области, связываемой с абсолютным слухом, рассматривается *planum temporale* в височной коре. Для музыкантов предполагается целостное восприятие задания, связанное с правым полушарием (в отличие от поэтапного, связанного с левым полушарием, у людей с техническим образованием), ростом объёма рабочей памяти и скорости анализа данных.

Целью работы стало исследование нейрофизиологических механизмов решения арифметических примеров на сложение у студентов с музыкальным и биологическим профилем образования

В исследовании приняли участие 22 студента музыкальных специальностей Ростовского Колледжа Искусств в возрасте 18–20 лет, женщины. В качестве контрольной группы участвовали 12 студентов биологических специальностей ЮФУ в возрасте 17–20 лет, женщины. Обследование предварялось

регистрацией ЭЭГ в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми и открытыми глазами. Основная часть тестирования включала выполнение задания бланковой корректурной пробы Бурдона – поиск заданной арабской цифры в течение 3 минут, и решение 50 примеров на сложение двухзначных чисел, чёрного цвета, предъявляемых на сером фоне на экране компьютера с использованием программной среды «Аудиовизуальный слайдер». Регистрация электрофизиологических показателей проводилась с использованием многоканального компьютерного электроэнцефалографа «Энцефалан-131-03». Обработка данных проводилась в программной среде Матлаб. Для корректурной пробы рассчитывались темп и продуктивность выполнения, для математической задачи – время и качество решения. Для всех задач рассчитывалась спектральная мощность четырёх диапазонов ЭЭГ.

При анализе времени решения примеров на сложение выявлено, что усреднённые значения данного показателя у музыкантов почти в 2 раза ниже, чем у биологов. Для музыкантов выявлена отрицательная корреляция времени и качества выполнения теста. При выполнении числовой корректурной пробы у всех студентов преобладали уровень устойчивости внимания выше среднего и средний, а также высокий уровень точности. У биологов точность выполнения теста была выше. У музыкантов со средней устойчивостью внимания происходит снижение продуктивности от 1-й к 3-й минуте, что может отражать понижение концентрации внимания. У биологов уровень продуктивности был ниже с минимумом на 2-й минуте. Аналогичная динамика показана при анализе темпа деятельности. У музыкантов с устойчивостью внимания выше среднего уровень продуктивности сохранялся стабильным. Различия между группами выявлены на 1-й минуте, где разница в продуктивности была двукратной, а темпа – трёхкратной. На 2-й и 3-й минуте у биологов выявлено снижение для обоих показателей. Таким образом, у музыкантов увеличение устойчивости внимания приводит к росту продуктивности и темпа работы. Стабильность значений показателей предполагает большую устойчивость внимания. Снижение темпа и продуктивности у биологов может говорить о снижении уровня внимания как характеристике группы.

При анализе ЭЭГ в состоянии спокойного бодрствования у музыкантов доминировали тета-фокус в центральных областях и мощный альфа-фокус в теменно-затылочной области. Открывание глаз сопровождалось тета- и альфа-десинхронизацией. Формировалась противофаза активации за счёт сдвига тета-фокуса в передние области и сохранения альфа-фокуса в теменно-затылочных областях. Для биологов показано доминирование альфа-диапазона в теменно-затылочных областях. В передних областях существовал тета-фокус. При открывании глаз наблюдалась альфа-десинхронизация, тета-фокус становился более диффузным. Противофаза альфа- и тета-фокусов отсутствовала. При выполнении задач у музыкантов происходило усиление тета- и альфа-активности в передних и задних областях, что отражало активацию системы произвольного внимания. У биологов уровень продуктивности был ниже, а точность выполнения – выше, что сопровождалось снижением ЭЭГ-активации. При сложении время решения и количество правильных ответов было выше у биологов. У музыкантов доминировали частоты тета-диапазона в лобно-центральной области, у биологов – частоты тета- и альфа-диапазонов. При неправильном ответе у музыкантов наблюдалось снижение, а у биологов – усиление ЭЭГ-активации.

Можно предполагать, что целостное решение у музыкантов приводит к увеличению темпа выполнения и снижению точности, и сопровождается тета- и альфа-активацией. Это свидетельствует о большей нагрузке на рабочую память и более мощной активации системы произвольного внимания, что требует вовлечения фронтоталамической системы и префронтальной коры. Поэтапное решение у биологов приводит к снижению темпа выполнения и росту точности, требует активации рабочей и долговременной памяти, и отражается в десинхронизации альфа-диапазона и сохранении тета-фокуса. Это связано с активирующими влияниями кортико-гиппокампальной системы долговременной памяти, и меньшей – префронтальной системы рабочей памяти.

АКТИВНОСТЬ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА СУСЛИКОВ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Р.А. Халилов, А.М. Джафарова, Э.З. Эмирбеков

*Дагестанский государственный университет, 367000, Российская Федерация, Республика Дагестан, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а
E-mail: dagbiofak@mail.ru; albina19764mail.ru*

Зимняя спячка мелких млекопитающих – это естественное гипометаболическое состояние. Оно развивается как эволюционно сложившаяся адаптация к условиям нехватки пищевых ресурсов и низких температур, при которой температура ядра тела падает (часто до 0–5 °С) и наблюдается сильное подавление всех физиологических процессов. Столь существенные изменения физиологического состояния животного требуют гибких механизмов адаптации ферментов, играющих важную роль в энергетическом метаболизме организма при его различных физиологических и патологических состояниях. Одним из таких ферментов является лактатдегидрогеназа (ЛДГ). В данной работе предпринято исследование активности и кинетических параметров ЛДГ мозга сусликов при зимней спячке.

Исследования были выполнены на малых сусликах *Spermophilus pygmaeus* Pall., отловленных в Буйнакском районе Республики Дагестан. Для индукции зимней спячки в конце октября сусликов перемещали в помещение с температурой 2–5 °С. После двух месяцев гибернации в середине баута спячки животных брали в эксперимент. Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически по убыли содержания НАДН в реакционной среде. Концентрационную зависимость активности определяли в диапазоне концентраций пирувата 0,025–25,6 мМ. Кинетические характеристики (константа ингибирования (K_i), максимальная скорость (V_m) и константа Михаэлиса (K_m)) вычисляли методом наименьших квадратов, используя в опции «нелинейное оценивание» уравнение Холдейна.

Исследование активности ЛДГ мозга сусликов в области низких концентраций пирувата в среде инкубации (0,025 до 1,6 мМ) показало, что зимняя спячка способствует её снижению. Так, при концентрации 0,8 мМ активность снижается на 20,2 %. Напротив, при высоких концентрациях субстрата (6,4–25,6 мМ) активность ЛДГ мозга у гибернирующих животных повышается. Это способствует изменению характера субстратной зависимости ЛДГ: концентрационная кривая демонстрирует смещение точки оптимума в область более высоких концентраций пирувата.

Расчёт кинетических характеристик ЛДГ мозга сусликов показал, что спячка способствует снижению V_{max} (на 25,5 %), при этом K_m и K_i увеличиваются на 43,2 на 93,9 %, соответственно. Таким образом, при гибернации происходит значительное (на 47,4 %) снижение отношения V_{max}/K_m , которое характеризует эффективность катализа фермента при физиологических концентрациях пирувата. Вместе с тем, гибернация увеличивает значения K_i на 93,9 %. Это способствует снижению параметра Q , характеризующего степень субстратного ингибирования ЛДГ, на 41,8 % и повышению значения $Sort$ (оптимальных концентраций субстрата) на 66,9 %. Анализ параметра $\Delta=K_m-K_i$, являющегося показателем диапазона концентраций субстрата, при котором фермент работает с максимальной эффективностью, показал, что спячка способствует его 2-кратному повышению.

Таким образом, при гибернации происходят значительные флуктуации кинетических свойств ЛДГ мозга сусликов, направленные на существенное снижение активности фермента при физиологических концентрациях пирувата. Биологический смысл обнаруженных изменений заключается, скорее всего, в следующем: подавление эффективности катализа ЛДГ может способствовать снижению числа оборотов гликолиза, что может являться одним из главных условий реализации углеводсберегающей стратегии у гетеротермных животных в период зимней спячки. Кроме того, это позволит ограничить накопление лактата и предотвратить, тем самым, развитие при спячке ряда патологических процессов.

АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРОСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО ИМПАКТНОЙ ЗОНЫ

*Н.П. Черникова¹, А.Г. Федоренко², С.С. Манджиева¹, М.В. Бурачевская¹,
В.А. Чаплыгин¹, Т.М. Минкина¹, Т.М. Хассан¹*

¹ Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

² Южный научный центр Российской академии наук, 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

E-mail: nat.tchernikova2013@yandex.ru; msaglara@mail.ru

Антропогенное воздействие на окружающую среду в настоящее время привело к существенному загрязнению почв и растений тяжёлыми металлами (ТМ), особенно вблизи промышленных объектов. Крупные предприятия энергетического комплекса и химической промышленности часто оказывают техногенное влияние на окружающую среду. Растения, обитающие в условиях длительного воздействия химического загрязнения, не имея возможности «уйти» от влияния стрессора, вынуждены приспосабливаться к нему, мобилизуя свои внутренние защитные ресурсы. Тяжёлые металлы вызывают у растений многочисленные изменения, происходящие на разных уровнях: организменном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном.

Целью исследования является изучение влияния многолетнего техногенного загрязнения на растения тростника обыкновенного (*Phragmites australis* Cav.).

Изучена импактная территория, использовавшаяся в качестве резервуара для сброса стоков химической промышленности. Исследованная площадка мониторинга № 1 является фоновой и представлена чернозёмом гидрометаморфизованным на аллювиальных отложениях. На расстоянии 700 м от площадки № 1 расположена площадка мониторинга № 2, почва которой характеризуется превышением ПДК (ОДК) по валовому содержанию Zn в 185 раз, Pb в 72 раза, Cd в 32 раза, Cr в 3 раза, Ni и Cu в 2 раза и, согласно классификации и диагностики почв России (2004), относится к хемоземам. Исследуемая мезофильная сукцессия района озера Атаманское представляет последнюю стадию, включающую «климаксовые» сообщества, выживающие в условиях очень сильного загрязнения окружающей среды. Это монодоминантные тростниковые группировки, состоящие из тростника южного (*Phragmites australis* Cav.).

Стандартные укусы для определения морфометрических измерений растений тростника проводили на площадках мониторинга во второй половине августа, когда вегетативные и генеративные части растений тростника достигают максимума, измерения проводили на свежесобранных растениях.

С помощью светооптической и трансмиссионной электронной микроскопии выявляли изменения в корнях тростника на гистологическом и цитологическом уровнях.

Экстремально высокое полиэлементное загрязнение почвы является стрессовым фактором для роста и развития тростника обыкновенного. У растений, произрастающих на техногенно-преобразованной почве наблюдается уменьшение показателей морфологического строения вегетативных и генеративных органов.

Светооптическое изучение полутонких срезов корней растений, выросших при загрязнении показало нарушение упорядоченного расположения клеток экзодермы, значительное сокращение размеров воздухоносных полостей и увеличение размеров клеток эндодермального слоя по сравнению с контрольным образцом.

На электроннограммах растений тростника, выросших на площадке мониторинга с высоким уровнем техногенного загрязнения в почве, выявлены существенные изменения ультраструктуры корня в результате техногенного загрязнения. В отдельных клетках была нарушена целостность тонопласта, и содержимое цитоплазмы проникло в центральную вакуоль, при этом отмечена высокая степень деструктивных изменений клеточных органелл. Структура митохондрий была гетерогенна: некоторые органеллы были набухшими и содержали разрушенные кристы. Идентификация других

цитоплазматических органелл была затруднена вследствие высокой степени их деструктивных изменений. В структурах ядра выявлены повышенная концентрация ядерного хроматина и нарушение целостности ядерной оболочки. Во многих клетках отмечено отложение электронно-плотного материала в виде тонкого слоя на поверхности цитоплазматических мембран и клеточных стенках, а также в виде отдельных комплексов в клеточных вакуолях.

Выявленные структурные изменения эпидермиса и мезодермы при воздействии ТМ препятствуют радиальному перемещению жидкости в корне от периферических участков и являются одной из причин снижения уровня поглощения и транслокации питательных веществ от корней к побегам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 19-29-05265мк) и гранта Президента (№ МК-2818.2019.5 и № МК-4015.2018.5). Исследования выполнены на оборудовании ЦКП Южного федерального университета «Высокие технологии», «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг».

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА «ВСХОДЫ – КОЛОШЕНИЕ» И ТИП ЦВЕТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ

Р.А. Агаев, Л.А. Беспалова, Е.В. Агаева, О.Ю. Пузырная

Национальный центр зерна им. П.П.Лукьяненко», 350012, Российская Федерация, г. Краснодар, центральная усадьба КНИИСХ

E-mail: lena.agaeva.69@bk.ru; kniish@kniish.ru

Одним из главных адаптационных признаков озимой пшеницы является продолжительность вегетационного периода, т.е. периода «всходы – колошение». Вегетационный период – это сумма отрезков времени, необходимая для прохождения отдельных стадий в развитии растений [1].

Обычно в селекционных программах решают две сложных задачи: первая – создать сорта, которые бы по продолжительности вегетационного периода максимально соответствовали динамике лимитирующих факторов среды (влаги, температура, продолжительность дня); вторая – создание скороспелых сортов с достаточно высоким уровнем урожайности в сочетании с комплексом других хозяйственно полезных признаков. Успешное решение этих задач невозможно без всестороннего изучения процессов, протекающих в растительном организме, особенно процесса цветения.

Известна общебиологическая закономерность: с увеличением продолжительности вегетационного периода в благоприятных условиях потенциальная продуктивность генотипов повышается [2]. Многие авторы, изучая продолжительность вегетационного периода озимой пшеницы, выделяют по срокам созревания следующие группы: ультраскороспелые, скороспелые или раннеспелые, среднеранние, среднеспелые, среднепоздние и позднеспелые. По мнению отдельных авторов, тип цветения у сортов пшеницы связан с продолжительностью вегетационного периода. Длительное открытое цветение может приводить к повышенному перекрестному опылению, что негативно сказывается на качестве семенного материала. В своём опыте мы разделили сорта по принятой в отделе селекции и семеноводства пшеницы и тритикале классификации на пять групп: ультраскороспелые, скороспелые, среднеранние, среднеспелые, среднепоздние.

2009 год отличался аномальными погодными явлениями (возвратные морозы в период стеблевания), что повлияло на тип цветения озимых колосовых. Сорта всех групп спелости цвели комбинированно, но в подавляющем большинстве открыто. Среднеранние сорта Таня, Васса, Шарادا, Грация и другие на 98,8 % цвели открыто. Группа среднеспелых сортов также отличалась открытым цветением (98,3 %). Наиболее закрыто цвели среднепоздние сорта, в частности Фортуна и Юка.

Погодные условия 2010 г. были вполне комфортными для озимых колосовых. Все сорта пшеницы мягкой озимой цвели комбинированно, но процент абсолютно закрытых цветков у всех групп спелости вырос. Наиболее закрыто цвела группа среднепоздних сортов: всего открытых цветков – 55,4 %.

В 2011 г. все сорта пшеницы мягкой озимой цвели смешанно (комбинированно) с преобладанием открытого типа цветения. Наибольший процент всего открытых цветков насчитывался у групп ультраскороспелых и скороспелых сортов – 98,9 % и 98,1 %.

2012 сельскохозяйственный год отличался очень высокой температурой воздуха в период цветения, очень низкой относительной влажностью воздуха и суховейными явлениями. В таких условиях тип цветения сортов всех групп спелости остался комбинированным, но процентное соотношение цветков несколько изменилось.

Так, скороспелые сорта Калым, Иришка, Нота цвели наиболее закрыто. Процент абсолютно закрытых цветков у них составил 71,3 %.

Таким образом, тип цветения в различной степени зависит от генотипа сорта, но и модифицируется условиями среды.

В 2010–2012 гг. лидером по открытому цветению была группа ультраскороспелых сортов, в которую вошли Юбилейная 100, Есаул, ЮМПА и др. Процент всего открытых цветков у них варьировал от 98,9 % в 2011 до 95,7 % в 2010 году. За три года исследований (2009–2011 гг.) наиболее закрытый характер цветения наблюдался у группы среднепоздних сортов Фортуна и Юка.

Наши многолетние исследования показали, что тип цветения зависит от генотипа сорта, от погодных условий, но наибольшая дисперсия обеспечивалась генотип-средовым взаимодействием.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вавилов, Н.И.* Теоретические основы селекции. М.: Наука, 1987. 511 с.
2. *Тищенко В.Н., Чекалин Н.М., Панченко И.А.* Продолжительность вегетационного и межфазных периодов и их корреляции с урожайностью в зависимости от условий года и генотипа озимой мягкой пшеницы. *Agromage.com*, 2016.

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КАЗАХСТАНА В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БРУЦЕЛЛЁЗУ

А.А. Адамбаева¹, И.Я. Нам², В.В. Заякин³

¹ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», 0500016, Казахстан, г. Алматы, пр. Райымбека, 223

²Северо-Западный институт управления РАНХиГС при Президенте РФ, 199178, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Средний проспект ВО, 57/43

³Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского, 241036, Российская Федерация, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14

E-mail: iyanam1@yandex.ru

Молекулярно-генетические подходы, в частности генодиагностика, широко используются в современной генетике, селекции и разведении крупного рогатого скота перспективных пород. Одно из наиболее перспективных направлений генодиагностики – это маркер-направленная селекция, используемая, в частности, для оздоровления животных от распространённых инфекционных заболеваний. Использование генов системы *BoLA* в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей ДНК, ответственных за формирование защитных реакций крупного рогатого скота, позволяет тестировать генетический полиморфизм, связанный с устойчивостью – восприимчивостью к распространённым инфекционным заболеваниям.

В частности, для гена *BoLA-DRB3*, связанного с устойчивостью – восприимчивостью коров к различным инфекционным заболеваниям, выявлено более 100 аллелей, из которых 58 можно выявить методом ПЦР-ПДРФ [1]. Использование этого метода позволило оценить разные породы КРС России, Беларуси, Казахстана на наличие/отсутствие генетической устойчивости или восприимчивости животных к вирусу лейкоза КРС [2, 3]

Связь генетического полиморфизма гена *BoLA-DRB3* с поражением животных бруцеллёзом до сих пор не изучалась, не смотря на актуальность этого вопроса.

Проблема ликвидации бруцеллёза является важнейшей для ветеринарной медицины и здравоохранения России и Казахстана. Бруцеллёз искоренён в большинстве регионов России, но в последние десятилетия эта болезнь получает всё большее распространение в животноводческих

хозяйствах Южного, Северо-Кавказского, Сибирского, Дальневосточного федеральных округов. В Казахстане бруцеллёз выявляется во всех регионах, ежегодно в республике регистрируется более 1,5 тысяч случаев впервые диагностированного бруцеллеза среди людей.

Настоящая работа была посвящена изучению аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* у пород мясного направления Казахстана – аулиекольской и казахской белоголовой, сравнению аллелотипов здоровых и больных коров этих пород и выявлению потенциальной возможности генетической устойчивости и восприимчивости КРС к бруцеллёзу.

Для исследования генетической устойчивости КРС к бруцеллёзу использовали пробы цельной крови из пяти областей Республики Казахстан. Больных животных отбирали по результатам серологического и бактериологического анализов. Проанализированы образцы животных двух пород: здоровых коров аулиекольской – 84 гол., казахской белоголовой – 73 гол., и больных коров – аулиекольской – 74 гол., казахской белоголовой – 73 гол.

Анализ аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* проводился методом ПЦР-ПДРФ.

Во всех четырёх группах исследуемых животных проявляется значительный аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* – от 21 до 24 аллелей. При этом частота встречаемости аллелей у здоровых и больных животных отличается.

У здоровых животных несколько повышены частота аллелей 3 и 8 (у обеих пород), аллеля 4 – у аулиекольской породы, аллеля 21 – у казахской белоголовой породы. Возможно эти аллели могут обеспечивать повышение генетической устойчивости к бруцеллёзу.

У больных коров аулиекольской породы частота аллелей *7, *10 и *18 в 2,5 – 6 раз выше, чем у здоровых. А у животных коров казахской белоголовой породы в группе больных бруцеллёзом наблюдается высокая частота встречаемости аллелей *7, *11 и *16. Можно предположить, что эти аллели могут быть связаны с восприимчивостью к бруцеллёзу.

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности продолжения генетических исследований, включив в них другие казахстанские породы КРС. Выявление аллелей устойчивости гена *BoLA-DRB3* позволит вести селекционную работу на повышение генетической устойчивости разных пород КРС к бруцеллёзу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Шайхаев Г.О., Захаров И.А. // Генетика. 1995. Т. 31. № 9. С. 1294–1299.
2. Nam I.Ya., Zayakin V.V., Smaznova I.A. et al. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. № 6 (1). P. 1903–1907.
3. Latypova Z., Sarbakanova S., Sultanov A. et al. // CURRENT SCIENCE. 2017. № 5. P. 2173–2186.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ ГОМОЗИГОТНОСТИ У СВИНЕЙ ЗАКРЫТЫХ КОММЕРЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ

С.Ю. Бакоев, Л.В. Гетманцева, Н.А. Зиновьева

*Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60
E-mail: siroj1@yandex.ru*

Прогон гомозиготности (РОН (run of homozygosity)), определяются как непрерывные участки гомозиготных генотипов, которые присутствуют у животного, поскольку оба родителя передают одинаковые гаплотипы своему потомству. Идентификация и характеристика РОН позволяют получить представление о том, как структура населения и демография развивались с течением времени, а также раскрыть генетические взаимоотношения между индивидуумами и определить уровень инбридинга в

популяции [1]. В последнее время ROH находит всё большее применение в поиске и идентификации участков генома, связанных с давлением отбора. Целью этой работы было идентифицировать и охарактеризовать ROH у племенных свиней крупной белой породы, разводимых в закрытой популяции в условиях хозяйства РФ.

Исследования проводили на свиньях крупной белой породы ($n=908$), разводимых в племенном хозяйстве РФ. Геномную ДНК экстрагировали из проб ткани свиней (ушной выщип) с помощью набора реагентов ДНК-Экстран-2 (ООО «НПФ Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Животных генотипировали, используя GGP_HD_Porcine BeadChip (Illumina Infinium array technology and GeneSeek custom content, USA), включающий 68 516 SNP, распределённых по всему геному свиньи. Контроль качества генотипа был выполнен с использованием PLINK v.1.9 для удаления образцов и SNP с частотой вызовов ниже 90 %. После редактирования 44 493 SNP были сохранены для исследования. Обрезание на основании неравновесного сцепления (LD) не было выполнено и, чтобы исключить короткий, общий ROH, происходящий от LD, была установлена минимальная длина ROH 1 Mb, согласно методике, предложенной в работе [1]. Все маркеры, прошедшие контроль качества, были использованы для расчёта ROH. Для ограничения количества обнаруженных ложных ROH были применены следующие ограничения [2]: минимальное количество SNP, включённых в ROH, было установлено равным 50 [1], минимальная длина ROH было установлено в 1 Mb [3], максимальное расстояние между соседними SNP составляло 1 Mb [4]. Ни гетерозиготные, ни отсутствующие генотипы не были разрешены в ROH. Для определения участков ROH был использован PLINK v.1.9, пакет R-detectRUNS-0.9.5 с использованием параметра $minLengthBps = 1000000$ bps, методом consecutiveRuns, основанный на поиске участков прогонов гомозиготности без окон и прямого сканирования генома SNP по SNP (SNP-by-SNP) [3]. Аннотацию генов, расположенных в областях ROH, проводили на базе VEP (<https://www.ensembl.org>), анализ обогащения генной онтологии (GO) проводили с использованием базы данных PANTHER (<http://pantherdb.org>). Для идентификации генов с QTL и их интерпретации использовали базу данных (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS>).

В наших исследованиях ROH были идентифицированы у 908 свиней крупной белой породы и в общей сложности определены 65 879 гомозиготных сегмента. ROH покрывал 18,89 % генома в изучаемой популяции и в среднем на каждое животное приходилось $72,55 \pm 9,79$ Mb с минимальным и максимальным значениями от 2 до 101 Mb, соответственно. Средняя длина ROH составляла 5,53 Mb, а наибольшая длина сегмента составила 106,63 Mb (999 SNP), который был расположен в SSC1. У свиней крупной белой породы, разводимых в рамках одного племенного хозяйства в РФ, были идентифицированы общие гомозиготные сегменты (21 ROH), наблюдающиеся у 40 %. Общие ROH были расположены следующим образом: SSC1 (19 %), SSC4 (28), SSC11 (14,3) и SSC15 (14,3 %) и в небольших долях в SSC2, SSC3, SSC5 и SSC14.

Результаты генной онтологии с точки зрения биологических функций генов, идентифицированных в длинных областях ROH показали, что в наибольшей степени эти гены связаны с клеточными и метаболическими процессами, которые вероятно могут лежать в основе перераспределения метаболических путей в связи с интенсификацией селекционных процессов. В целом результаты показали, что дальнейшие исследования, направленные на изучение аутозиготности посредством ROH, представляют большой интерес для программ разведения в животноводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ceballos F.C., Joshi P.K., Clark D.W. et al. // Nat. Rev. Genet. 2018. Vol. 19 (4). P. 220–234.
2. Ferenčaković M., Sölkner J., Kapš M., Curik I. // J. Dairy. Sci. 2017. Vol. 100 (6). P. 4721–4730.
3. Marras G., Gaspa G., Sorbolini S. et al. // Anim. Genet. 2015. Vol. 46 (2). P. 110–121.

Исследования выполнены в рамках задания Министерства высшего образования Российской Федерации ГЗ № 0445-2019-0027. АААА-А18-118021590134-3

ОСОБЕННОСТИ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ D-ПЕТЛИ мтДНК У ОВЕЦ МЕРИНОСОВЫХ ПОРОД ОТЕЧЕСТВЕННОЙ И ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Н.Ф. Бакоев, Л.В. Гетманцева

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60
E-mail: nekruz82@bk.ru

На сегодняшний день мериносовые породы овец разводят на различных континентах, однако в процессе пороодообразования, с учётом климатических и экономических особенностей, породы приобрели свои уникальные особенности. В связи с этим целью нашего исследования стало изучение нуклеотидной последовательности участка D-петли мтДНК у овец мериносовых пород Южного региона РФ (сальской, ставропольской и советский меринос) и поиск вариативных локусов, обуславливающих сходство и различия между мериносовыми породами отечественной и зарубежной селекции.

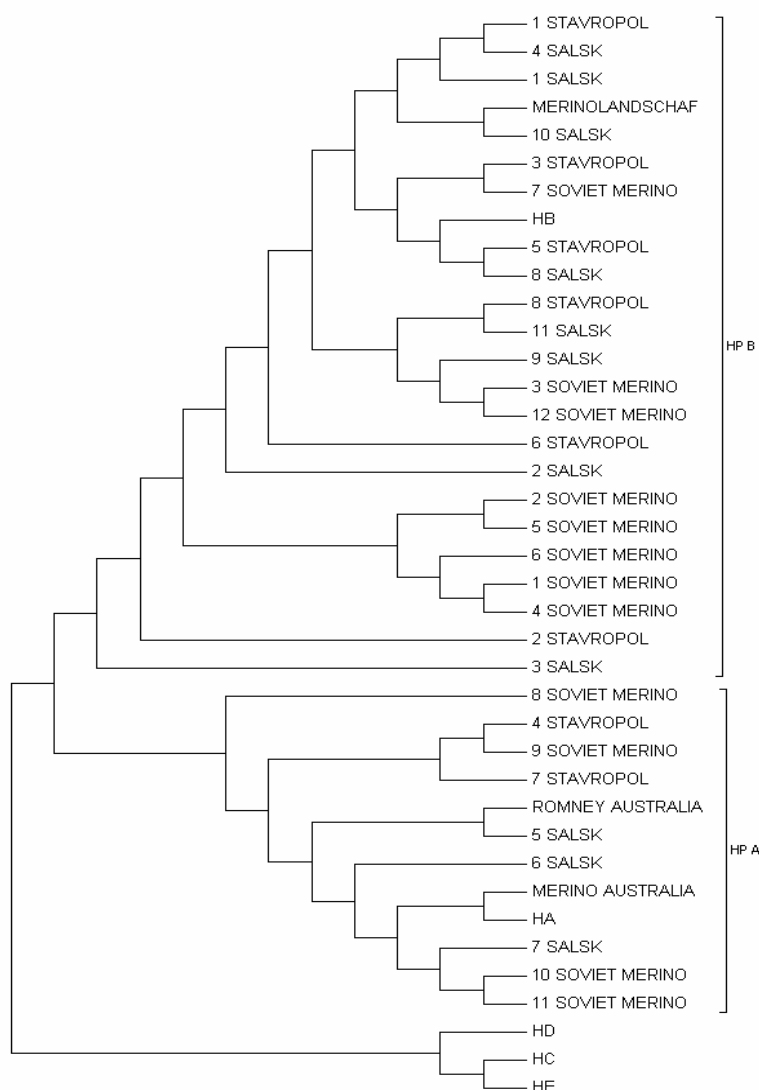


Рис. Филогенетические отношения между исследуемыми овцами пород сальская, ставропольская и советский меринос и гаплогруппами А, В, С, D, Е построены с использованием метода максимального правдоподобия, основанного на модели ТамураНей

Исследование мтДНК проводили на овцах породы сальская ($n=19$), ставропольская ($n=8$) и советский меринос ($n=12$). ДНК выделяли из образцов ткани. Для амплификации фрагментов D-петли мтДНК длиной 1352 п.н. использовали праймеры: F 5'- GGT CTT GTA AAC CAG AGA AGG AG - 3' и R 3'- TGG AGT CAG TAG ACT CAT CTA GG - 5'. Редактирование и выравнивание последовательностей проводили при помощи программ BioEdit v7.2.6 и MEGA 7. Референсной была выбрана последовательность Accession NC_001941.1 NCBI. Для проведения сравнительного анализа между мериносовыми породами овец отечественной и зарубежной селекции из базы NCBI были взяты последовательности участка D-петли мтДНК, принадлежащие породам овец: австралийский меринос (HM236174.1) и мериноландшаф (NC_001941.1). Для определения принадлежности исследуемых образцов к гаплогруппам были выбраны последовательности, относящиеся к гаплогруппам А (DQ852286), В (DQ852282), С (DQ852284), D (DQ852288) и Е (DQ852280).

В результате были получены фрагменты мтДНК области D-петли длиной 1179 п.н. и определена первичная структура нуклеотидов между позициями 15437–16616 п.н. Построение филогенетического дерева методом максимального правдоподобия показало чёткое разделение исследуемых овец на два кластера. При этом первый кластер относился к гаплогруппе В, характерной для европейских домашних овец, а второй кластер к – гаплогруппе А, доминирующей у азиатских овец, а также Новой Зеландии и Австралии (рис.).

Полученные нами результаты показывают, что в нашей выборке овец мериносовых пород, разводимых в Южном регионе РФ (сальской, ставропольской и советский меринос) фрагмент мтДНК D-петли в большей степени идентичен европейским мериносам. Однако в среднем у 30 % исследуемых овец прослеживается гаплотип, характерный для мериносовых овец австралийской селекции.

Исследования выполнены в рамках задания Министерство науки и высшего образования Российской Федерации ГЗ №АААА-А18-118021590138-1

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ОБЫКНОВЕННОЙ СЛЕПУШОНКИ *Ellobius talpinus* НА ТЕРРИТОРИИ ПОВОЛЖЬЯ, УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА, ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И СРЕДНЕЙ АЗИИ

А.С. Богданов

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Российская Федерация, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26
E-mail; bogdalst@yahoo.com*

Обыкновенная слепушонка *Ellobius talpinus* имеет весьма обширный ареал: от Крыма до Новосибирской обл. и Алтайского края в меридиональном направлении и от Жигулей до предгорий Копетдага – в широтном. Для *E. talpinus* характерны слабая морфологическая изменчивость и, в отличие от двух других близких видов подрода *Ellobius* (восточной слепушонки *E. tancrei* и алайской *E. alaicus*), стабильный кариотип, $2n=NF=54$ [1–3]. Однако недавно в ходе предварительного исследования полиморфизма нуклеотидной последовательности полного митохондриального гена цитохрома *b* (*cyt b*, 1143 п.н.) и короткого фланкирующего его участка гена *tRNA-Thr* (27 п.н.) у 16 обыкновенных слепушонок из разных частей ареала [4], была выявлена отчётливая дифференциация *E. talpinus* по меньшей мере на четыре внутривидовые формы: первая (I) объединяет слепушонок из Крыма, вторая (II) – особей из Волгоградской обл., с левобережья Дона и правобережья Волги, третья (III) – экземпляров из Заволжья, Южного Урала, с левобережья Иртыша и из Восточного

Туркменистана, четвёртая (IV) – слепушонка правобережья Иртыша. Средние значения генетических дистанций (D) между этими формами оказались довольно высокими (0,021–0,051). Было высказано предположение, что такая дифференциация возникла в результате длительной изоляции популяционных группировок *E. talpinus* географическими барьерами, в частности – крупными реками, полностью пересекающими ареал вида (Волга, Иртыш), а социальность и подземный образ жизни, присущие слепушонкам, ускорили процесс фиксации мутаций в разобщённых популяциях. Тем не менее, для уточнения распространения выявленных внутривидовых форм *E. talpinus* и проверки гипотезы об изолирующем влиянии на популяции этого вида Волги и Иртыша (а возможно, и других крупных рек, например, Оби) необходимо исследование дополнительного материала.

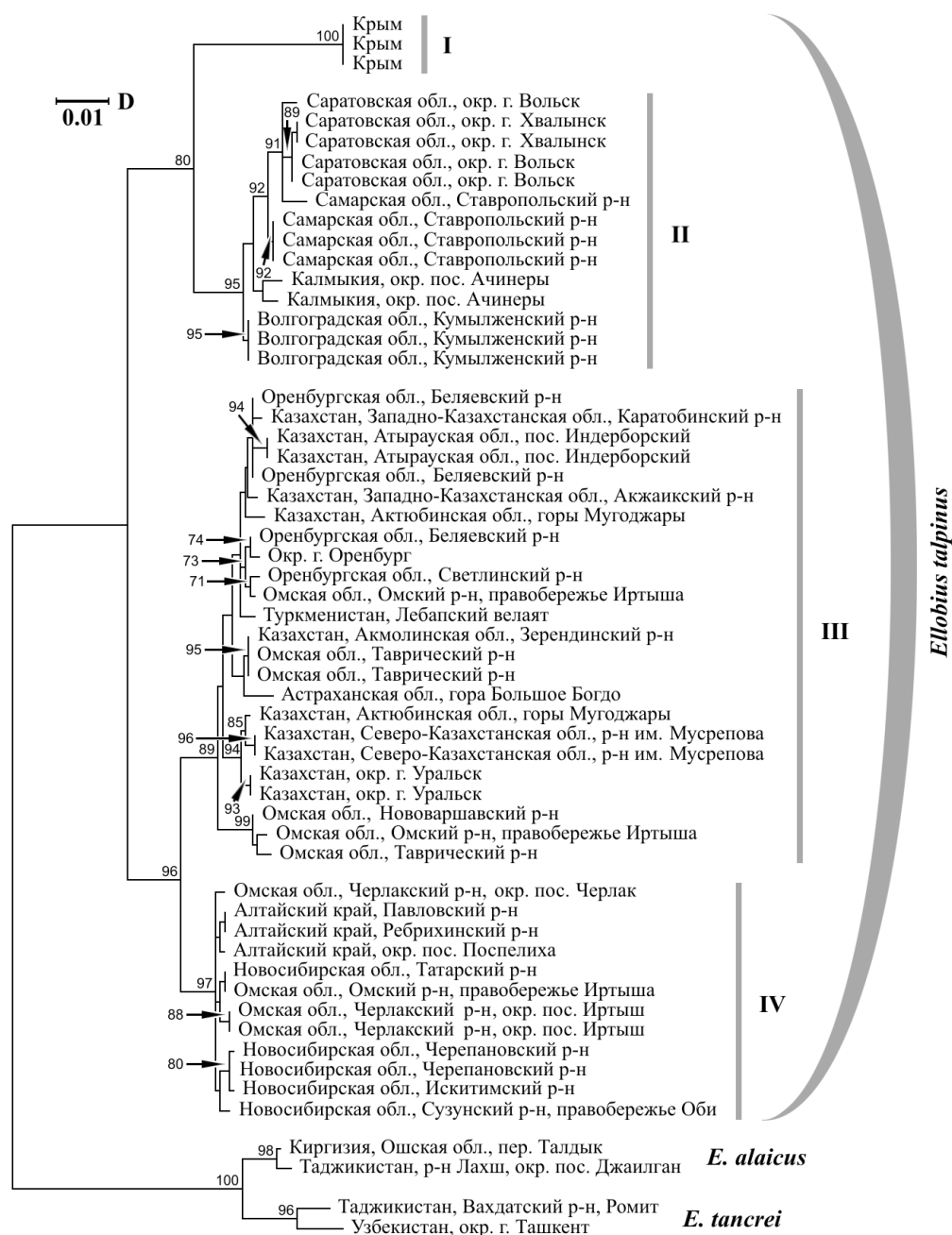


Рис. ML-дендрограмма, построенная при сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена *cyt b* (1143 п.н.) отдельных особей *E. talpinus*, *E. tancrei* и *E. alaicus*. В узлах ветвления древа указаны значения бутстреп-индекса, превышающие 70 %.

С этой целью в настоящей работе, помимо 16 изученных ранее особей *E. talpinus*, были проанализированы по нуклеотидным последовательностям полного гена *cut b* ещё 37 обыкновенных слепушонок из 26 пунктов с территории от правобережья Волги до правобережья Оби (зоны распространения внутривидовых форм II–IV). В качестве аутгруппы взяты по две особи *E. tancrei* и *E. alaicus*.

Полученные результаты в целом подтвердили выводы предыдущего исследования [4]. Несмотря на существенное увеличение объёма общей выборки и добавление материала из ряда других пунктов, дендрограмма, построенная с помощью компьютерной программы Mega 6.06 при использовании метода ML (Maximum Likelihood) и модели нуклеотидных замен TN93+G (Tamura-Nei model with gamma distributed), демонстрирует распределение митотипов обыкновенных слепушонок в четыре кластера (см. рис.), соответствующих тем же четырём внутривидовым формам, о которых упоминалось выше (I–IV). Формы II и III полностью разделены Волгой, и таким образом, её роль в формировании данных генетически дискретных популяционных группировок несомненна. Изолирующее влияние Иртыша на распространение III и IV форм явно прослеживается, но как оказалось, не является абсолютным: колония слепушонок, относящихся к форме III по митохондриальной ДНК, была обнаружена на правобережье, на небольшом участке (около 2 км) на восточной окраине Омска, в непосредственной близости к популяциям формы IV. По-видимому, небольшое количество слепушонок смогло переправиться с левого берега Иртыша на правый либо благодаря неоднократным локальным изменениям русла реки в прошлом, либо используя созданные человеком мосты и переправы (в том числе временные, возведённые, например, при строительстве города). В пользу последней версии свидетельствует то обстоятельство, что инвазивная колония была обнаружена недалеко от городской черты. Способность преодолевать горные реки по искусственно созданным мостам ранее предполагалась также для восточных и алтайских слепушонок [2]. Возможно этими же причинами обусловлены слабые генетические различия между обыкновенными слепушонками право- и левобережья Оби: их митотипы, вместе с таковыми особей большинства популяций правобережья Иртыша составляют компактный кластер, соответствующий внутривидовой форме IV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В.Г. // Цитология. 1967. Т. 9. № 7. С. 879–883.
2. Bakloushinskaya I., Lyapunova E.A., Saidov A.S. et al. // Comparative Cytogenetics. 2019. Vol. 13, № 2. P. 147–177.
3. Bakloushinskaya I.Yu., Matveevsky S.N., Romanenko S.A. et al. // Cytogenetic Genome Research. 2012. Vol. 136. P. 199–207.
4. Богданов А.С., Лебедев В.С., Зыков А.Е., Баклушинская И.Ю. // Генетика. 2015. Т. 51. № 12. С. 1433–1438.

ОСОБЕННОСТИ СЕЛЕКЦИИ КЛЕЩЕВИНЫ

Г.В. Бокий¹, Е.В. Картамышева², В.Е. Кондаурова²

¹Ростовский государственный медицинский университет, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

²Донская опытная станция – филиал Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта», 346754, Российская Федерация, Ростовская обл., Азовский р-н, пос. Опорный, ул. Жданова, 2

E-mail: gbokiy63@mail.ru; secretdos@ya.ru

В настоящее время перед отечественными сельхозпредприятиями стоит задача увеличить посевные площади и производство маслосемян клещевины в нашей стране с целью снижения импорта дорогостоящего касторового масла. Успешное решение данной проблемы во многом зависит от набора возделываемых сортов этой важной культуры. В связи с этим назрела необходимость создания

новых высокопродуктивных сортов клещевины, обладающих коротким вегетационным периодом и адаптивными свойствами.

Известный отечественный учёный в области генетики, селекции и семеноводства масличных культур, доктор сельскохозяйственных наук, Картамышев Владимир Георгиевич предложил новую ботаническую классификацию вида *Ricinus communis* L. на основе изучения мировой коллекции клещевины и использования закона гомологических рядов, открытого Н.И. Вавиловым. Данная система позволяет целенаправленно проводить гибридизацию и размножение селекционного материала. Также В.Г. Картамышев предложил актуальные схемы ускорения селекционного и семеноводческого процесса клещевины.

Клещевина – однодомное растение. Изучение генетики наследования по половому признаку позволило обнаружить закономерность в изменении количества цветков разного пола на одном растении. Согласно исследованиям, наибольшую ценность представляют растения с женскими цветками. Их количество напрямую влияет на продуктивность сортов, а также помогает получать большее количество гибридных семян. В результате долгой и кропотливой работы на Донской опытной станции изобретены методы, позволяющие получить полностью женские растения клещевины. Испытания показали, что такие растения более урожайны по сравнению с обоеполями. Проведение массового отбора женских растений на участках размножения сортов и селекционных номеров приводит к постепенному увеличению их числа. Таким образом, они обеспечивают перекрёстное опыление и расширяют генетическую основу селекционного материала.

Немаловажное значение имеет не только изучение генетики пола клещевины, но и её биологии. Определённое влияние на половые признаки цветков клещевины оказывают условия среды. При благоприятных условиях (оптимальный температурный режим и увлажнение) сексуализация сдвигается в женскую сторону. Таким образом, можно повысить количество женских растений за счёт увеличения площади их питания.

Клещевина проявляет свойства гетерозиса по урожаю. Результаты изучения её гибридов на Донской опытной станции показали, что в проявлении эффекта гетерозиса имеет значение принадлежность компонентов гибридизации к различным биологическим группам, выделенным В.Г. Картамышевым. Наибольший результат показывают скрещивания разновидностей фиолетовая (*subsp. violaceus*) и сизая (*subsp. glaucus*) с зелёной (*subsp. viridis*). Успешность работы по гетерозису клещевины заключается в использовании не только межлинейной гибридизации, но и скрещивании выровненных сортов и семей. Вместе с тем сохранение высокой продуктивности гибридов в течение ряда поколений свидетельствует о большой их ценности в качестве исходного селекционного материала.

Новые сорта клещевины должны обладать повышенной урожайностью и масличностью семян, высокой приспособленностью к зоне возделывания, иметь сокращённый вегетационный период и устойчивость к фузариозу. Решению этих задач будет способствовать применение современных генетических методов селекции клещевины.

Важнейшее условие эффективного отбора – точная идентификация генотипа по фенотипу. Согласно последним достижениям науки, необходимо привлекать в традиционную селекцию клещевины новые методы биотехнологии, генетики, экологии и информатики, чтобы повысить эффективность и скорость отбора по селекционно-ценным признакам и ускорить создание селекционного продукта, удовлетворяющего нынешние потребности нашего государства.

ВЛИЯНИЕ ВЕЕРООБРАЗНОГО ЖИЛКОВАНИЯ ЛИСТА НА КРАЕВЫЕ ЯЗЫЧКОВЫЕ ЦВЕТКИ У ПОДСОЛНЕЧНИКА

О.М. Борисенко, Ю.В. Чебанова, Я.Н. Демури

Подсолнечник традиционно известен в мире как одна из главных масличных культур. Фенотипически такие растения представляют собой однокорзиночные формы с мощным стеблем, несущим черешковые листья. Листья у подсолнечника имеют сетчатое жилкование, характерное для двудольных. Однако в генетических и признаковых коллекциях существуют образцы, листья которых имеют необычное веерообразное жилкование. В подобных случаях боковые жилки отходят от центральной под более острым углом (35–40°) в сравнении с обычным сетчатым (около 60°). Веерообразное жилкование листьев как спонтанная мутация было обнаружено у подсолнечника в 20-х годах XX века [1]. Позднее была изучена её генетическая природа, которая определяется рецессивным геном *vs* [2]. В начале XXI в. с помощью химического (этилметансульфонат) мутагенеза на подсолнечнике были получены формы, также обладающие веерообразным жилкованием. В результате проведённого генетического анализа установили наличие двух неаллельных генов, обеспечивающих независимый контроль морфологических изменений листьев у мутантов [3].

В селекции масличного подсолнечника мутация веерообразного жилкования не используется. Данная мутация с успехом может быть применена в селекции декоративного подсолнечника, к которому в настоящее время стал проявляться интерес на территории Российской Федерации. Было отмечено, что линии, несущие ген *vs*, обладают более узкими, по сравнению с обычными линиями, краевыми язычковыми цветками.

С целью оценки плейотропного эффекта гена *vs* на ширину язычковых цветков провели скрещивание разных по жилкованию листа форм. Линия подсолнечника ВИР130-3 обладает веерообразным жилкованием, линии КГ49 и 424924 имеют листья с сетчатым жилкованием. Длину и ширину язычковых цветков у линий и гибридов определяли количественно с помощью линейки. У каждого растения измеряли 10 цветков на 3–5-й день цветения корзинки. Для линий и гибридов первого поколения определяли показатели на десяти растениях. У гибридов второго поколения измеряли всю расщепляющуюся популяцию (251 растение у ВИР130-3×424924 и 281 растение у КГ49×ВИР130-3). Для минимизации среднего влияния на проявление признаков все исследуемые образцы выращивали в один полевой сезон.

По длине язычков цветков линии подсолнечника ВИР130-3, КГ49 и 424924 отличались незначительно – 43,2, 50,4 и 49,5 мм, соответственно. По ширине ВИР130-3 имела самые узкие язычковые цветки – 10,4 мм, у КГ49 они были самыми широкими – 17,6 мм, у 424924 ширина составляла 13,3 мм. Различия по ширине достоверны, $НСР_{05} = 0,7$ мм. У гибридов первого поколения КГ49×ВИР130-3 и ВИР130-3×424924 листья были с сетчатым жилкованием, что подтверждает рецессивный характер мутации веерообразного жилкования. Длина и ширина краевых язычковых лепестков была сопоставима и составляла 55,4 и 22,4 мм для комбинации КГ49×ВИР130-3 и 58,3 и 20,3 мм для скрещивания ВИР130-3×424924. У гибридов F_2 наблюдали расщепление по жилкованию в соотношении, характерном для моногенного наследования, т.е. веерообразные листья были отмечены у четвертой части расщепляющихся популяций. Язычковые цветки различались по ширине в зависимости от типа жилкования. Так, у растений с сетчатым жилкованием листьев в обеих изучаемых комбинациях ширина язычковых цветков в два раза превышала аналогичный показатель у вееролистных и составляла 23,6 мм у КГ49×ВИР130-3 и 22,8 мм у ВИР130-3×424924. Язычковые цветки вееролистных растений были заметны уже – 11,6 мм у КГ49×ВИР130-3 и 11,4 мм у ВИР130-3×424924. Таким образом, гипотеза о плейотропном действии гена *vs* на ширину краевых язычковых цветков у подсолнечника в данном этапе исследований может быть верифицированной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. СПб.: ВИР, 2003. 209 с.
 2. Škaloud V., Kovačik A. // Proc. 8th Intl. Sunflower Conf. Minneapolis, Minesota, USA, July 23–27. 1978. P. 490-497.
 3. Сорока А.И. // Вестник Донецкого национального университета. Сер. А: Естественные науки. 2012. № 1. С. 196–199.
-

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Е.Д. Васильева¹, Е.И. Рачек², Д.Ю. Амвросов², В.П. Васильев³

¹Зоологический музей Московского государственного университета, 125009, Российская Федерация, г. Москва, ул. Большая Никитская, 2

²ТИНРО-Центр, Владивосток, 690950, Российская Федерация, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4

³Институт проблем экологии и эволюции РАН – ИПЭЭ, 119071, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский пр., 33, E-mail:

E-mail: vas_katerina@mail.ru; evgenyi.rachek@tinro-center.ru; d.amvrosov@yandex.ru; vasvik1943@gmail.com

Среди позвоночных животных рыбы обладают наиболее лабильными и разнообразными механизмами определения пола. Условно можно выделить три категории таких механизмов.

1. Механизмы, которые обеспечивают определение пола в зависимости от температуры среды.
2. Механизмы, обеспечивающие в норме синхронный или последовательный гермафродитизм.
3. Половые хромосомы, причем у рыб встречаются как XX/XY, так и ZZ/ZW системы, с преобладанием первой.

Выяснение механизмов определения пола и половой дифференциации у рыб кроме общебиологического значения представляет также и практический интерес. Это связано с тем, что половой диморфизм по скорости роста – обычное явление у рыб. Кроме того, выращивание некоторых видов, прежде всего осетровых, связано с получением пищевой икры. Поэтому разработка технологий управления полом, в значительной степени основанных на знаниях о механизмах определения пола, имеет немаловажное значение. В настоящее время существует несколько способов выявления механизмов определения пола у рыб: изучение кариотипов, включая синаптемные комплексы, при этом цитологически дифференцированные половые хромосомы обнаружены только у 10 % изученных видов [1]; гормональная инверсия пола с последующими скрещиваниями и анализом соотношения полов в потомствах; получение мейотического гиногенетического потомства и затем анализ соотношения полов. Последний метод мы используем в своих исследованиях механизмов определения пола у осетровых.

В 2011 г. эксперименты по получению гиногенетического потомства и выявлению характера определения пола у стерляди *Acipenser ruthenus* проводили на Лучегорской НИС ТИНРО. В двух сериях опытов использовали яйцеклетки от семи самок стерляди и сперму от одной особи амурского осетра *A. schrenckii*, который был выбран в качестве отцовского вида в связи с возможностью простой идентификации гиногенетического и гибридного потомств с помощью морфологического анализа. Инактивацию генетического аппарата спермиев осуществляли с помощью коротковолнового УФ-излучения. Для получения мейотического гиногенеза применяли тепловой шок (от 36,9 до 33,8 °C в

течение 2 мин.). Полученные нами данные по цитологической и анатомической дифференциации гонад показывают, что в гиногенетическом потомстве трёх самок стерляди соотношение полов 4:1 в пользу самок. Это позволяет принять гипотезу о женской гетерогаметности стерляди. Однако полученное соотношение не соответствует 1 (WW) : 1 (ZZ), что следует ожидать при отсутствии кроссинговера и при отсутствии влияния аутосом. В связи с этим можно полагать, что имеет место кроссинговер между W и Z хромосомами, а генетическая структура потомства будет следующей: самки – WW и WZ (сурперсамки WW жизнеспособны) и самцы – ZZ.

Наиболее неожиданными оказались результаты исследования полового состава в гиногенетическом потомстве севрюги *A. stellatus*. Все исследованные гиногенетические особи, полученные от трёх самок, оказались самцами ($n=75$). Для объяснения этих результатов можно сделать ряд предположений. 1. Севрюга обладает женской гетерогаметностью. При этом в результате мейотического гиногенеза образуются только два класса эмбрионов: ZZ (самцы) и WW (самки); эмбрионы ZW (самки) не возникают по причине отсутствия кроссинговера половых хромосом. Это может быть связано с близостью полоопределяющих локусов и центромер в половых хромосомах или с какими-либо другими причинами, в частности с тем, что полоопределяющие локусы или один из них находятся в микрохромосомах. В свою очередь конструкция WW является летальной, в результате в гиногенетическом потомстве остаются только самцы. 2. Севрюга характеризуется женской гетерогаметностью с системой половых хромосом Z0, при этом, как и в первом случае, кроссинговер половых хромосом отсутствует. 3. Система определения пола у севрюги более сложная и связана с балансом половых хромосом и аутосом.

Изучение механизмов определения пола у других видов осетровых (*A. transmontanus*, *A. brevirostrum*, *A. baerii*) [2–4] также выявило женскую гетерогаметность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Devlin R.H., Nagahama Y. // Aquaculture. 2002. Vol. 208. P. 191–364.
2. Flynn S.R., Matsuoka M., Reith M. et al. // Aquaculture. 2006. Vol. 253 (1–4). P. 721–727.
3. Van Eenennaam A.L., Van Eenennaam J.P., Medrano J.F., Doroshov S.I. // Journal of Heredity. 1999. Vol. 90 (1). P. 231–233.
4. Vasil'eva E.D., Grunina A.S., Recoubratsky A.V. et al. // 6th International Symposium on Sturgeon, October 25-31, 2009 Wuhan, Hubei Province, China. Harmonizing the relationships between Human Activities and Nature: the Case of Sturgeons. Book of Abstracts. Oral Presentation. Wuhan, 2009. P. 86–88.

Исследования ЕДВ проводятся в рамках гостемы АААА-А16-116021660077-3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ СИСТЕМЫ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДЛЯ РУТИННОГО ТЕСТИРОВАНИЯ КОЗ

В.В. Волкова, Т.Е. Денискова, А.А. Филипченко, Н.А. Зиновьева

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60
E-mail: moonlit_elf@mail.ru; horarka@yandex.ru; filipchenko-90@mail.ru

Российское козоводство до сих пор остается медленно развивающейся отраслью животноводства, что, вероятно, связано с преобладанием традиционных методов селекции.

Использование ДНК-маркеров позволяет оценить генетическое разнообразие, определить уровень инбридинга, проанализировать генетическую структуру и чистоту популяций, а также подтвердить достоверность происхождения. Тест-системы, предназначенные для рутинного применения в козоводстве, должны характеризоваться высокой информативностью, однозначностью в интерпретации результатов, универсальностью и низкой себестоимостью. Следует отметить, что существующая мультиплексная панель [1] основана на использовании праймеров, синтезированных за рубежом и включающих в свой состав дорогостоящую флуоресцентную метку NED™ (Applied Biosystems).

В связи с этим целью нашей работы стали дизайн и сборка тест-системы анализа полиморфизма микросателлитов на основе отечественных флуоресцентных меток для рутинного применения в козоводстве. Выбор микросателлитных маркеров для включения в панель был основан на рекомендации Международного общества по генетике животных (ISAG). В результате были отобраны девять локусов: OARFCB20, INRA005, ILSTS19, SRCRSP8, INRA006, ILSTS87, INRA063, INRA023 и CSRD247, объединённых в одну мультиплексную панель. Праймеры были синтезированы в компании ЗАО Евроген. В качестве флуоресцентных меток выбраны красители FAM и R6G с неперекрывающимися спектрами и с низкой стоимостью синтеза. Оптимизация протокола ПЦР-амплификации была произведена с использованием функции градиент на термоциклере Professional Standard Gradient (Biometra, Германия). Детекция фрагментов была выполнена на генетическом анализаторе ABI3130xl (Applied Biosystems, США). Оценка информативности системы проводилась на 85 козах трёх пород различного происхождения и направления продуктивности: порода 1 (Pop1, $n=27$) – аборигенная, шёрстная; порода 2 (Pop2, $n=29$) – заводская отечественной селекции, шёрстная; порода 3 (Pop3, $n=29$) – заводская иностранной селекции, молочная. Для подтверждения происхождения особенно важны такие показатели, как вероятность совпадения генотипов двух независимых образцов (PI) и оценка вероятности исключения родителей (PE). При увеличении числа анализируемых локусов вероятность совпадения генотипов у двух животных для каждой породы стремится к нулю (рис. 1).

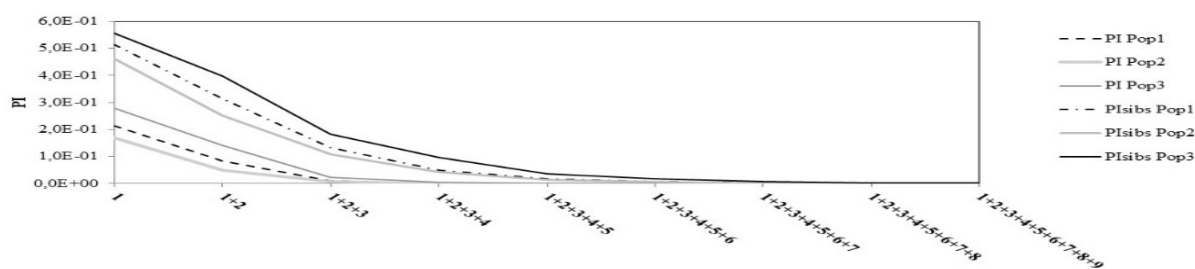


Рис. 1. Изменение вероятности совпадения генотипов с увеличением числа локусов

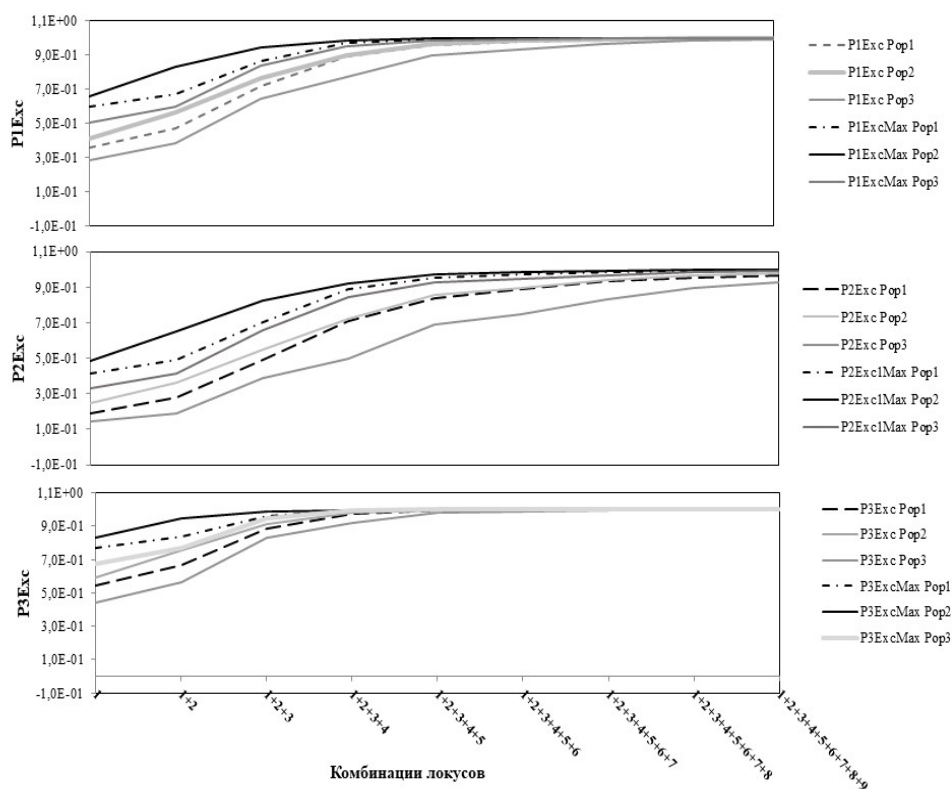


Рис. 2. Вероятность исключения генотипов при разных уровнях: P1 – оба родителя известны; P2 – при отсутствии генотипов одного из родителей; P3 – исключение предполагаемой пары родителей

Таким образом, созданная тест-система отвечает всем предъявляемым требованиям и может быть рекомендована для рутинного применения для подтверждения происхождения коз. Планируется создание второй дополнительной расширенной панели для популяционно-генетических исследований коз и для оценки уровня их генетического разнообразия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров С.Н., Харзинова В.Р., Гладырь Е.А. и др. // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 11. С. 60–63.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-20006.

ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛОФОНДА РЕГИОНАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОДЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ STR-МАРКЕРОВ

В.В. Волкова, О.С. Романенкова, О.В. Костюнина, Н.А. Зиновьева

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60
E-mail: moonlit_elf@mail.ru; ksilosa@gmail.com; kostolan@yandex.ru

Холмогорская порода крупного рогатого скота выведена на территории Архангельской области и была использована как исходный материал для создания тагильской, истобенской и бестужевской пород [1, 2]. Животные холмогорской породы отличаются крепким телосложением, приспособленностью к суровому климату и неприхотливостью к условиям кормления и содержания, сохраняя при этом высокий потенциал молочной продуктивности. Основным фактором, ускоряющим темпы совершенствования холмогорского скота, является эффективное использование быков-производителей высокопродуктивной голштинской породы [3], в результате чего большинство животных во всех регионах являются помесью различной кровности холмогорской и голштинской пород. Поэтому для повышения конкурентоспособности холмогорского скота необходимо создание систем селекции, направленных не только на улучшение хозяйственно-полезных качеств, но и на сохранение генетической чистоты породы.

В связи с этим целью нашего исследования стала молекулярно-генетическая характеристика аллелофонда популяций холмогорской породы крупного рогатого скота с помощью STR-маркеров. Выборка холмогорского скота была представлена 289 головами, в том числе старо-камчатской (СТ_КАМ, $n=68$) и старо-комийской группами (СТ_КОМИ, $n=24$), северным (ХОЛМ, $n=19$), татарским (ТАТ, $n=53$) и печорским ($n=125$) внутривидовыми типами. В качестве группы сравнения было использовано 26 проб голштинской породы (ГОЛШ). Полиморфизм 11 STR-локусов (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA126, BM1818, ETH225 и BM1824) изучали с помощью генетического анализатора ABI3130xl (Applied Biosystems, США). Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе GenAIEx 6.503 и Structure 2.3.4. Группа СТ_КАМ характеризовалась наибольшим числом идентифицированных аллелей ($8,36 \pm 0,78$), а группа СТ_КОМИ - наименьшим ($5,55 \pm 0,61$). Эффективное количество аллелей варьировало от 3,62 у ХОЛМ до 4,20 у ТАТ, соответственно. Во всех изучаемых популяциях холмогорского скота наблюдался избыток гетерозигот, который колебался от незначительного в группах ПЕЧ ($F_{is}=-0,008$) и СТ_КАМ ($F_{is}=-0,012$) до умеренно-высокого в группах СТ_КОМИ ($F_{is}=-0,026$) и ХОЛМ ($F_{is}=-0,040$). Кластерный анализ показал, что изучаемые группы холмогорского скота характеризовались разной степенью прилития крови голштинов. Так, при $K=2$ наиболее высокий уровень принадлежности к голштинам имели животные из групп ТАТ ($Q_{1/2}=0,984 \pm 0,002$) и СТ_КАМ ($Q_{1/2}=0,894 \pm 0,023$). Наблюдаемая тенденция не изменялась с увеличением числа предполагаемых кластеров. Критерий членства в собственном кластере, который, вероятно, соответствует исконному холмогорскому скоту, был максимальным в группе ПЕЧ ($Q_{2/2}=0,892 \pm 0,021$) при $K=2$. Тем не менее, начиная с $K=3$, внутри группы ПЕЧ наблюдается разделение на две четко дифференцированные подгруппы с высокими критериями членства в собственном кластере: $Q_{2/3}=0,892 \pm 0,031$ и $Q_{3/3}=0,937 \pm 0,016$, соответственно. При этом первая подгруппа ПЕЧ характеризовалась уникальным генетическим составом, который не встречался в других популяциях холмогорского скота. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исконный генофонд холмогорского скота не утрачен, что является важным фактором для разработки эффективных программ по сохранению данной породы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. СПб., 1994. 472 с.
2. Калашикова Л.А., Павлова И.Ю., Хабибрахманова Я.А. и др. Племенная работа с холмогорской породой скота / Лесные Поляны, 2016. 78 с.
3. Мартынова Е.Н., Исупова Ю.В. // Пермский аграрный вестник. 2018. № 1 (21). С. 125–131.

При выполнении исследований было использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Работы проведена в рамках выполнения НИР Министерства науки и высшего образования РФ по теме 0445-2019-0026 (AAAA-A18-118021590138-1).

ОЦЕНКА ОБРАЗЦОВ РИСА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЛИТЕЛЬНОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ

А. Г. Галаян¹, П.И. Костылев², А.С. Казакова³

¹Азово-Черноморский инженерный институт в г. Зернограде, 347740, Российская Федерация, Ростовская обл., г. Зерноград, ул. Ленина, 21

²Аграрный научный центр «Донской», 347740, Российская Федерация, г. Зерноград, Научный городок, 3

³Донской государственный аграрный университет, 347740, Российская Федерация, Ростовская обл., г. Зерноград, ул. Ленина, 21

E-mail: allagalaan@gmail.com

Для России наиболее актуальным вариантом использования устойчивости к затоплению является борьба с сорными растениями за счёт глубокого слоя воды, который сорняки преодолеть не в состоянии. Введение локусов устойчивости в высокопродуктивные образцы, адаптированные к определённым агроклиматическим условиям, считают наиболее перспективным направлением селекции сортов, устойчивых к абиотическим стрессам.

Объектом исследований в 2018 г. служили 65 линий шестого поколения сорта из гибридных комбинаций: BR-11 x Новатор, CR-1009 x Новатор, Inbarga 3 x Новатор, TDK-1 x Новатор, полученные в АНЦ «Донской». Материнские позднеспелые родительские формы несли ген *Sub1A*, отцовский краснодарский раннеспелый сорт Новатор – нет. Ген устойчивости к длительному затоплению *Sub1A* выявляли с помощью ПЦР-анализа растений по маркеру доминантного аллеля RM7481. Опытным вариантом оценки устойчивости риса к длительному затоплению было анаэробное прорастание. Семена помещали в стеклянную пробирку (2,5 см в диаметре и 15 см в высоту), заливали дистиллированной водой глубиной 10 см и инкубировали при температуре 28 °С в темноте, не меняя воду. На 15-й день измеряли длину проростка (ростка и корешка). Контрольным вариантом было аэробное прорастание на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при температуре 28 °С в темноте. Через семь суток проростки измеряли и помещали в пробирки под слой воды 10 см при температуре 28 °С. На 7-й день инкубации измеряли длину проростка и сравнивали с начальной величиной.

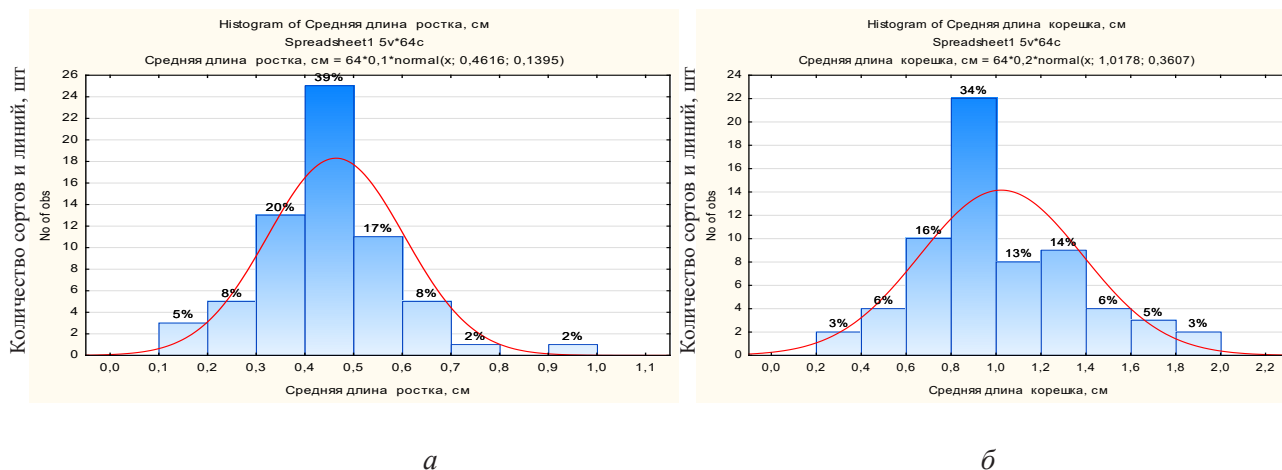


Рис. 1. Распределение сортов и линий риса при аэробном прорастании на третий день закладки опыта: а) по средней длине ростка; б) по средней длине корешка

В результате исследований было установлено, что при анаэробном прорастании через 15 суток большинство изучаемых сортов и линий (63 %) имели среднюю длину ростка от 0,5 до 2,5 см, только 11 % обладали максимальной средней длиной проростков от 3,0 до 4,5 см. Максимальное значение средней длины ростка в интервале от 3,10 до 4,50 см было у линий 6469 (4,49 см), 6502 (4,28 см), 6521

(3,98 см), 6465 (3,64 см), 6552 (3,42 см), 6446 (3,20 см), 6528 (3,10 см). Только у трёх линий и одного сорта был обнаружен проросший корешок, его длина составила у линии 6592 – 0,7 см, 6506 – 0,6 см, 6474 – 0,5 см, у сорта Южанин – 0,45 см. Анализ аэробного прорастания в чашках Петри показал, что на третий день закладки опыта, максимальные значения средней длины ростка в интервале от 0,14 до 0,98 см были у линий 6461 (0,98 см), 6517 (0,77 см), величина средней длины корешка варьировала в интервале от 0,44 до 1,98 см, максимум – у линий 6461 (1,98 см), 6543 (1,62 см) (рис. 1).

На восьмой день закладки опыта средняя длина ростка колебалась от 0,26 до 1,03 см (максимум у линии 6469 – 1,03 см), средняя длина корешка варьировала от 0,27 до 1,98 см (у линии 6461 – 1,98 см (рис. 2).

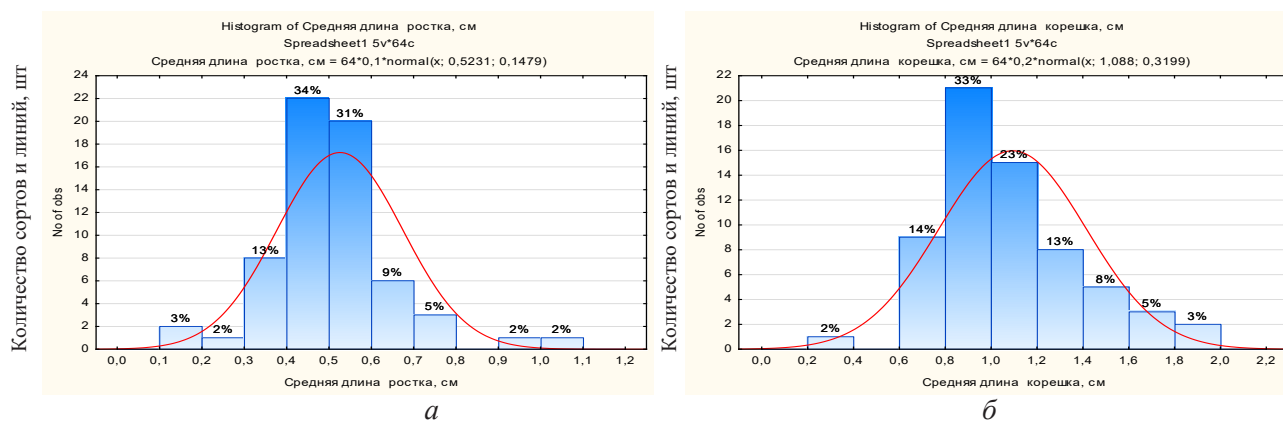


Рис. 2. Распределение сортов и линий риса по средней длине ростка при аэробном прорастании на восьмой день закладки опыта: а) по средней длине ростка; б) по средней длине корешка

По данным изменения величины прироста образцов можно судить о наличии или отсутствии гена *Sub1A*. Через неделю после переноса проростков из чашек Петри в пробирки у 24 образцов и сортов увеличение длины проростка варьировало от 0,1 до 0,4 см (максимум у линии 6549). Минимальный прирост, или состояние покоя у изучаемых образцов свидетельствует о возможности присутствия в них гена *Sub1A*. Минимальный прирост, или состояние покоя у изучаемых образцов свидетельствует о возможности присутствия в них гена *Sub1A*. Поэтому был проведен анализ ДНК-маркеров этого гена. По данным ПЦР-анализа, изученные линии распределились на три группы по наличию гена *Sub1A*.

Рецессивные гомозиготы: 6417, 6436, 6437, 6469, 6504, 6513, 6530, 6545, Новатор (реципиент), 6549, 6466, доминантные гомозиготы *Sub1A*: 6429, BR-11 (донор), 6461, 6484, 6505, 6529, гетерозиготы: 6477, 6546, 6592. Оказалось, что образцы без прироста под водой несли ген *Sub1A* в гомо- и гетерозиготном состоянии, а у растущих далее он отсутствовал.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ЛОШАДЕЙ БАШКИРСКОЙ ПОРОДЫ ПО ЛОКУСУ ПИГМЕНТООБРАЗОВАНИЯ *Agouti*

А.М. Гареева, И.Ю. Долматова, А.В. Юрина

Башкирский государственный аграрный университет, 450001, Российская Федерация, г. Уфа, ул. 50-летия Октября 34
E-mail: alfiya.gareeva4444@yandex.ru; dolmat@list.ru

Поскольку окраска шерстного покрова лошади в некоторых породах является важным критерием отбора, то тема наследственной детерминации масти имеет определённое практическое значение. В коневодстве сопоставление мастей родителей и потомства может служить генетическим маркером

при проверке племенных записей, а точная идентификация генотипов производителей по локусам, детерминирующим окраску, важна для широкомасштабной селекции с управлением структурой породы по фенотипам масти.

У аборигенной башкирской породы лошадей, являющейся национальным символом Республики Башкортостан, наиболее распространёнными являются окрасы «дикого типа», которые называют общим термином «саврасые». Считается, что саврасая масть является генетическим «родителем» всех других окрасов дикого типа, к которым относят также каурюю и мышастую. По данным, представленным в ГПК племенных лошадей башкирской породы, более 50 % производящего состава имеют саврасую масть. Вторая по частоте встречаемости (18,6 %) – гнедая масть; третья (9,4 %) – мышастая. Затем в порядке убывания представлены следующие масти: рыжая (4,7 %), буланая (3,5), серая (3,0), соловая (3,1), караковая (2,1), вороная (1,6), игренева (0,7), чалая (0,4) и бурая (0,1 %).

Важнейшими локусами, осуществляющими генетический контроль масти лошадей являются *Extention (MC1R)* и *Agouti (ASIP)*. Гены (*A*, *At* и *a*), расположенные в локусе агути, отвечают за распределение пигмента по телу животного. Доминантный аллель *A* распределяет чёрный пигмент так, что получается гнедая масть, а при наличии гена *E* локуса *Extention* в процессе эмбриогенеза переключает часть меланоцитов на синтез рыжего пигмента. Рецессивный аллель *a* распределяет чёрный пигмент по всему телу, приводя к образованию вороной масти. Промежуточное положение занимает аллель *At*, наличие которого приводит к образованию караковой масти.

Целью исследования являлся молекулярно-генетический анализ структуры популяций лошадей башкирской породы по локусу пигментобразования *Agouti (ASIP)*. Объектом исследования послужили лошади башкирской породы Уфимского конезавода № 119 Республики Башкортостан ($n=355$). Выявление полиморфизма в локусе *Agouti* проводили методом АР-ПЦР с использованием специфических праймеров на основе опубликованных нуклеотидных последовательностей.

Таблица

Частоты генотипов и аллелей по локусу *Agouti* у лошадей башкирской породы

Масть	%	Частота генотипов			Частота аллелей	
		<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>	$p(A) \pm m_p$	$q(a) \pm m_q$
Саврасая	56,9	0,29	0,58	0,13	0,577±0,025	0,423±0,025
Мышастая	17,4	0,08	0,26	0,66	0,210±0,037	0,790±0,037
Рыжая	9,0	0,28	0,44	0,28	0,500±0,063	0,500±0,063
Соловая	4,2	0,13	0,54	0,33	0,400±0,089	0,600±0,089
Гнедая	6,7	0,21	0,50	0,29	0,458±0,072	0,542±0,072
Серая	2,0	0,57	0,43	0,00	0,786±0,109	0,214±0,109
Вороная	1,4	0,20	0,20	0,60	0,300±0,145	0,700±0,145
Буряя	0,6	0,50	0,00	0,50	0,500±0,250	0,500±0,250
Караковая	0,6	0,00	1,00	0,00	0,500±0,250	0,500±0,250
Изабелловая	0,6	0,00	0,50	0,50	0,250±0,217	0,750±0,217
Чубарая	0,3	0,00	0,00	1,00	0,000±0,000	1,000±0,000
Пегая	0,3	1,00	0,00	0,00	1,000±0,000	0,000±0,000
В среднем $n = 355$		0,24	0,49	0,27	0,487±0,019	0,513±0,019

Из огромного многообразия лошадиных мастей (всего их насчитывается более 30), в исследуемой популяции выявлено 12, причем подавляющее их большинство (56,9 %) имеют саврасую масть (табл.). На втором месте по частоте – мышастая масть (17,4 %). Гнедые лошади по численности (6,7 %) на четвёртом месте после рыжих (9,0 %).

При анализе генетической детерминации наиболее распространённых мастей, следует отметить, что они, безусловно, определяются несколькими локусами, полиморфизм которых в данной статье не

рассматривается. На молекулярном уровне сегодня выявляются два аллеля (A и a) локуса *Agouti* и три генотипа, соответственно (AA , Aa и aa). Лошади саврасой масти в основном (с частотой 0,58) по локусу *Agouti* имеют гетерозиготный генотип Aa . Частота гомозиготного рецессивного генотипа aa у лошадей саврасой масти – 0,13, а у лошадей мышастой и вороной мастей – 0,66 и 0,60, соответственно. Причем у лошадей названных мастей частота доминантного аллеля A значительно ниже частоты рецессивного аллеля и составляет, соответственно, 0,21 и 0,30. Интересна детерминация караковой масти, которую называют ещё «вороной в загаре». Таких лошадей, окрас которых является своеобразной смесью вороной и гнедой мастей, выявлено хоть и незначительное количество, но все до единой они имеют гетерозиготный генотип Aa . Частота данного генотипа также преобладает (0,50) у гнедых лошадей. Соловая, бурая и изабелловые окрасы считаются производными рыжей масти, однако генетическая их детерминация, по результатам наших исследований, выглядит различной. Так, у лошадей бурой масти не выявлено гетерозиготных генотипов, а частоты генотипов AA и aa равны и составляют 0,5. У лошадей изабеллового окраса не выявлено генотипа AA . У лошадей рыжей масти имеются все три генотипа с преобладанием гетерозигот (0,44) и равным количеством (0,28) доминантных и рецессивных гомозигот.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ СВИНЕЙ

Л.В. Гетманцева, Н.Ф. Бакоев, О.В. Костюнина, С.Ю. Бакоев, А.В. Радюк

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60

E-mail: ilonaluba@mail.ru

Основой селекции животных является отбор конкретных особей с желательными признаками. Репродуктивная способность свиноматок как основа непрерывного и эффективного производства базируется на продуктивности маток по количеству потомства, числу опоросов и сроку хозяйственного использования. Для исследования генетической архитектуры воспроизводительных признаков большие надежды возлагают на GWAS, по результатам которых в базе данных PigQTLdb представлены SNPs, ассоциированные с признаками, характеризующими воспроизводительную продуктивность свиней. Однако характер связей SNP с признаками продуктивности может различаться в популяциях, а также иметь ряд особенностей, обусловленных породой свиней. Для более глубокого понимания эффектов SNPs необходимо проводить исследования, позволяющие оценить воспроизводимость полученных ассоциаций на различных группах свиней. Целью работы было провести оценку эффектов SNPs на репродуктивные показатели свиноматок крупной белой породы и ландрас, разводимых в условиях племенного хозяйства РФ. Для реализации этой задачи из базы PigQTLdb выбрали 20 SNPs, показавшие по результатам GWAS значимые ассоциации, а также гены-кандидаты *PRLR*, *LEP* и *GH*, отмеченные ранее в качестве генетических маркеров воспроизводительной продуктивности у свиней и продолжительности жизни у людей [1, 2].

Подбор праймеров проводили согласно нуклеотидной последовательности, представленной в базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Олигонуклеотидные праймеры и эндонуклеазы рестрикции для идентификации SNP методом PCR–PLRF подбирали с помощью программ Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>). При отсутствии сайта рестрикции использовали метод пиросеквенирования (PSQ). Исследования проводили на свиноматках крупной белой породы (КБ, $n=296$) и ландрас (Л, $n=216$), разводимых в условиях племенного хозяйства в России. Все животные имели одинаковые условия содержания и кормления. Геномную ДНК экстрагировали из проб ткани свиней (ушной выщип) с помощью набора реагентов ДНК-Экстран-2 (ООО «НПФ Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя. По результатам тестирования определяли частоты аллелей и генотипов SNPs у свиней КБ и Л и, используя

Principal Components Analysis (PCA), оценивали породную дифференциацию исследуемого поголовья. Ассоциативный анализ проводили с использованием смешанной линейной модели по следующим признакам: количество поросят при рождении (гол.), количество живых поросят при рождении (гол.), масса гнезда при рождении (кг) по данным первого, второго и последующих опоросов, а также общее количество опоросов за весь период содержания свиноматок. На основе расчётных данных, полученных по результатам моделей, оценивали аддитивный и доминантный эффекты генотипов SNPs по t-test.

В результате были разработаны локальные системы генотипирования выбранных SNPs, которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на изучение генетической архитектуры и её связи с признаками продуктивности свиней. Анализ распределения частот аллелей и генотипов по SNPs выявил особенности, связанные с породой свиней, что необходимо учитывать при оценке эффектов. Полученные результаты показали значимые эффекты SNPs на изучаемые признаки свиней КБ и Л. Некоторые из них были локализованы в генах, биологические функции которых связаны или влияют на развитие продуктивных признаков. Это SNP rs80956812 (SSC1: 164,674,664) локализован в гене *SMAD6* (SSC1: 164,657,086-164,734,703), SNP rs81421148 в гене *AKT3* (SSC10: 16441465..16741745), SNP rs81289355 (SSC11: 23,410,214) в гене *ENOX1* (SSC11: 23,237,692-23,894,699), SNP rs81379421 (SSC3: 27,307,613) в гене *XYLT1* (SSC3: 27,164,991-27,492,892), SNP rs80867243 (SSC5: 87,337,099) в гене *ELK3* (SSC5: 87,285,230-87,354,212) и SNP rs80962240 (SSC13: 52,784,022) в гене *FOXPI* (SSC13: 52,348,094-52,974,267). Проведённые расчёты позволили установить эффекты полиморфизма генов *PRLR*, *GH* и *LEP* на воспроизводительные признаки свиней пород крупная белая и ландрас. Однако особый интерес представляют установленные эффекты этих генов на признаки продуктивного долголетия свиней. В целом полученные результаты способствуют пониманию генетических механизмов репродуктивных признаков и могут оказать положительное влияние на программы разведения свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ma X., Li P.H., Zhu M. et al. // Animal. 2018. Vol. 14. P. 1–9.
2. Wang Y., Ding X., Tan Z. et al. // Animal Genetics. 2018. Vol. 49 (2). P. 127–131.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-016-00050 А (оценка эффектов SNPs) и в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ГЗ №АААА-А18-118021590138-1 (исследование генов PRLR, LEP и GH).

СЕЛЕКЦИЯ ЦМС ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП СПЕЛОСТИ, ВЫНОСЛИВЫХ К ВИРУЛЕНТНЫМ РАСАМ ЗАРАЗИХИ OROBANSE CUMANA WALLR

О.Ф. Горбаченко, Ф.И. Горбаченко, В.Д. Горбаченко, Т.В. Усатенко, Н.С. Лучкин, Н.А. Житник, Е.Г. Бурляева

*Донская опытная станция им. Л.А. Жданова – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта», 346754, Российская Федерация, Ростовская обл., Азовский р-н, пос. Опорный, ул. Жданова, 2
E-mail: gnudos@mail.ru*

Подсолнечник в России является одним из основных источников пищевого растительного масла и высокобелковых кормов. От производства семян этой культуры в значительной степени зависит

обеспеченность многих отраслей промышленности маслами, а животноводства ценными кормовыми добавками и в целом обеспечение продовольственной безопасности страны.

Посевные площади подсолнечника в России выросли за 16 лет (2001–2018) более чем в 2 раза и составили 8,6 млн га, а урожайность в среднем на 0,25–0,30 т/га.

Одним из реальных путей увеличения валовых сборов семян подсолнечника является рост урожайности и расширения посевных площадей под гибридами этой культуры. Для этого необходимо создавать высокопродуктивные гибриды подсолнечника разного периода вегетации и направлений использования, устойчивых или толерантных к заразихе, ложной мучнистой росе адаптированных к выращиванию в различных экологических зонах страны.

Для создания новых высокоурожайных гибридов особую актуальность приобретает наличие нового исходного материала, устойчивого к вредителям, болезням и высоковирулентным расам заразихи, которые возникли и получили распространение в последние 10–15 лет. Проведённые обследования посевов подсолнечника на полях Ростовской области, а также оценка семян сортов и гибридов на специально заложенном полевом участке, инфицированном семенами заразихи, собранной в различных районах подтвердили возникновение новых вирулентных рас растения-паразита [1]. Проведённый учёными ЦБ ВНИИМК мониторинг рас заразихи на посевах подсолнечника Волгоградской, Ростовской, Оренбургской областей, Краснодарского и Ставропольского краев и Казахстана показал наличие агрессивных рас заразихи F, G, H [2, 3].

Для создания и оценки линий подсолнечника, выносливых к новым самым вирулентным расам заразихи использовали сорта, образцы из мировой коллекции ВИР, гибриды отечественной и зарубежной селекции, синтетики. Полевые исследования выполняли по общепринятой методике, разработанной для подсолнечника во ВНИИМК и на станции [4].

Применяя метод многократного самоопыления, гибридизации и оценки на выносливость к более агрессивным расам заразихи в селекционном питомнике, специально заложенном инфекционном участке по заразихе и в осенне-зимний период в условиях теплицы получен новый исходный селекционный материал подсолнечника для создания новых материнских линий. Ежегодно в питомниках изучали более 1000 линий разных инцухт поколений (J_1 – J_{10}). Одновременно с изучением линий по селекционно-ценным признакам проводили их оценку по общей и специфической комбинационной способности методом топкросса, начиная с J_3 – J_4 поколений.

Лучшие по селекционно-ценным признакам линии переводили на стерильную основу *N. petiolaris*, которая передаёт мужскую стерильность создаваемым аналогом и обеспечивает высокую завязываемость семян не только под бумажными изоляторами, но и при свободном цветении. Проведённые многолетние исследования позволили нам получить ценные для гетерозисной селекции ЦМС линии ML 47, ML 115, ML 45, ML 127, ML 65 и другие толерантные к комплексу рас заразихи А, В, С, D, E, G, H, характеризующиеся высокой урожайностью, масличностью и другими хозяйственно ценными признаками. На основе полученных ЦМС линий ML 45 и ML 127 созданы гибриды Горстар, Горфилд внесенные в Госреестр селекционных достижений РФ и допущены к использованию в 5, 6, 7, 8, 9 регионах с 2018 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горбаченко Ф.И., Усатенко Т.В., Горбаченко О.Ф. // Масличные культуры, 2010. № 144–145. С. 25–30.
2. Антонова Т.С., Ситало Н.М., Арасланова Н.М. и др. // Масличные культуры: Науч.-техн. бюлл. ВНИИМК. 2009. Вып. 1 (140). С. 31–37.
3. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Рамазанова С.А. и др. // Масличные культуры: Науч.-техн. бюлл. ВНИИМК. 2011. Вып. 1 (146–147). С. 127–130.
4. Методика проведения полевых агротехнических опытов с масличными культурами / Под общ. ред. В.М. Лукомца: 2-е изд. перераб. и доп. Краснодар. 2010. 328 с.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЁЛТЫХ ОКРАСОВ У КОШЕК ПОРОДЫ КУРИЛЬСКИЙ БОБТЕЙЛ

Ж.А. Елисеева^{1,2}, Э.О. Бычкова^{1,2}, Л.В. Барабанова², А.В. Марков¹

¹Зоогеи, Центр ветеринарной генетики, 194156, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, 24/9, лит. Б

²Кафедра генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета, 199034, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: zhannayeliseeva@gmail.com; elina@zoogen.org; l.barabanova@spbu.ru

Рыжий и золотой окрасы, являясь разновидностями жёлтого окраса, широко представлены в разных породах кошек. Хорошо известен вариант рыжего окраса, связанный с доминантной мутацией в гене *O* (Orange), локализованном в X-хромосоме. В то же время в ряде пород кошек встречается рецессивный рыжий окрас, наследование которого не связано с полом. Данная группа окрасов получила название «янтарные». Вариации окрасов данной группы встречаются у норвежской лесной и у бурманской кошек и имеют названия «амбер» и «рассет», соответственно. Формирование этих окрасов связано с мутациями в гене меланокортинового рецептора (*MC1R*), что приводит к нарушению работы рецептора. В результате в волосяных фолликулах не вырабатывается эумеланин [1, 2]. В становлении золотого окраса принимают участие как эумеланин, так и феомеланин. Распределение пигментов наблюдается в форме полос. В золотом окрасе встречаются варианты, когда полосы пигментов чередуются и встречаются варианты без чередования полос, однако при этом полоса феомеланина всегда находится в основании волоса, а полоса эумеланина на конце волоса. До настоящего времени ни для одной породы кошек не было молекулярно-генетических данных, объясняющих появление золотого окраса. В этом плане особый интерес представляет порода курильский бобтейл.

Это порода короткохвостых кошек российского происхождения, в которой встречаются как варианты золотого окраса, так и рецессивного рыжего окраса. Последний отличается от рецессивного рыжего норвежской лесной и бурманской кошек и имеет собственное название «сердолик».

С целью выяснения природы фенотипа «сердолик» у кошек породы курильский бобтейл было проведено секвенирование полноразмерного гена *MC1R*. В результате проведённого анализа была выявлена делеция, размером 30 нуклеотидов, которая приводит к потере 10 аминокислотных остатков в области 3-й цитоплазматической петли *MC1R* [3]. Обнаруженная делеция соответствует аллели e^c гена *E* (Extension). Чтобы оценить частоту встречаемости данной делеции у Курильских бобтейлов нами были проанализированы 93 уникальных пробы ДНК этих животных. Молекулярно-генетический анализ показал, что 50 кошек оказались гомозиготами по аллелю дикого типа (*E/E*) и имели различные варианты окрасов, за исключением фенотипов «сердолик» или «золото». 17 животных с окрасом «сердолик» были гомозиготами по интересующей нас мутации (e^c/e^c). Среди оставшихся 26 гетерозигот 23 особи имели золотой окрас и 3 кота имели иные окрасы. Анализ последних трёх животных показал, что два из них несли в гомозиготном состоянии дополнительную мутацию в гене *ASIP* [3]. Известно, что эта мутация приводит к фенотипу «неагути», т.е. сплошному окрасу, в то время как золотой окрас проявляется только при нормальной работе гена *ASIP*.

Полученные данные позволяют заключить, что фенотип «сердолик» возникает в случае гомозиготного состояния по аллели e^c , связанной с обнаруженной делецией гена *MC1R*. Можно предположить, что мутантная аллель e^c в комбинации с аллелью дикого типа *E* и при нормальной работе гена *ASIP* приводит к формированию золотого окраса. В то же время в анализируемой выборке один кот, имеющий генотип E/e^c , имел не золотой вариант «агути». Возможно, в данном случае присутствуют дополнительные факторы, препятствующие проявлению золотого окраса.

Впервые получены результаты, объясняющие причину образования нового окраса «сердолик» и возможную причину окраса «золото» в породе кошек курильский бобтейл. Дальнейшие исследования

разновидностей жёлтых окрасов у кошек имеют большое значение, как для селекционной работы, так и для понимания молекулярных механизмов пигментации у млекопитающих в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peterschmitt M., Grain F., Arnaud B. et al. // Animal genetics. 2009. Vol. 40, № 4. P. 547–552.
2. Gustafson N. A., Gandolfi B., Lyons L. A. // Animal genetics. 2017. Vol. 48, № 1. P. 116–120.
3. Eizirik E., Yuhki N., Johnson W. E. et al. // Current Biology. 2003. Vol. 13. P. 448–453.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ РОДА *Rhagades* Wallengren, 1863 (LEPIDOPTERA, ZYGAENIDAE)

К.А. Ефетов, З.С. Лазарева

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, 295051, Российская Федерация, Республика Крым, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7
E-mail: efetov@ma.cfuv.ru; zaya_sm@mail.ru

С каждым годом всё большее признание и распространение получает инициатива ДНК-штрихкодирования организмов, стартовавшая в 2003 г. Целью этого проекта является получение молекулярных «паспортов» для любого живого существа на планете, которые затем могут быть использованы для видовой идентификации биологического образца вне зависимости от стадии развития организма. Участки ДНК, используемые в этих исследованиях, называют ДНК-штрихкоды. В рамках программы The Barcode of Life Data Systems (BOLD) с центром в Biodiversity Institute of Ontario (University of Guelph, Канада) под руководством профессора К.А. Ефетова («Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского») выполняется международный научный проект «ZYGMO» по секвенированию 5'-участка гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы (ДНК-штрихкода) у представителей семейства Zygaenidae (Lepidoptera). Вышеуказанное семейство широко исследуется экологами, биохимиками, биологами, так как Zygaenidae являются биоиндикаторными видами, а также имеют интересные особенности метаболизма, в частности, способны синтезировать цианогенные соединения из аминокислот. Данная публикация посвящена палеарктическому роду *Rhagades* (Zygaenidae: Procrinae, Procrini), представленному пятью видами, среди которых есть как виды-вредители, так и редкие эндемичные виды.

Нами были расшифрованы последовательности гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы у 16 экземпляров, принадлежащих ко всем пяти видам изучаемого рода. С помощью программы DNAsp v.5 было детектировано 78 полиморфных сайтов с общим количеством мутаций – 86, число парсимонийно-информативных сайтов составило – 75, число гаплотипов – 7. При этом доля транзиций была 50,6 %, а трансверсий – 49,4 %. В результате анализа ДНК-штрихкодов (длиной 600 пар оснований и более), полученных для четырёх видов рода *Rhagades*, выявлено распределение всех последовательностей между четырьмя BIN (Barcode Index Number), каждый из которых принадлежит одному виду.

В соответствующем ДНК-штрихкоду участке первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы длиной 219 аминокислот выявлено 12 точек изменчивости (5,5 %). Ранее позиция 123 была детектирована нами как варибельная для рода *Zygaena* и рода *Jordanita* (в этом положении определяются либо гидрофобный глицин, либо полярный серин). У рода же *Rhagades* во всех исследованных последовательностях эта позиция была стабильна, здесь находится только серин. Аминокислоты в позициях 34 и 162 отличаются у *Rhagades* (*Rhagades*) *pruni* от других видов. Такая же ситуация с позициями 30 и 33 у *Rhagades* (*Naufockia*) *brandti* и с позициями 13, 94, 104,

130, 159 у *Rhagades (Wiegelia) amasina* и 67, 94, 104, 130, 161 у *Rhagades (Wiegelia) predotae*. Причём положение 171 является подродоспецифичным для *Wiegelia*, так как в этой позиции у всех трёх видов данного подрода (*Rh. amasina*, *Rh. predotae* и *Rh. tarmanni*) присутствует только аланин (в отличие от представителей подродов *Naufockia* и *Rhagades*, у которых здесь находятся другие аминокислоты). Резюмируя всё выше сказанное, можно отметить, что род *Rhagades* отличается высокой степенью гетерогенности аминокислотных последовательностей. Согласно ранее полученным результатам, этот род характеризуется также большой гетерогенностью кариотипов. Так, *Rh. (N.) brandti* (материал из Ирана) имеет в гаплоидном наборе 31 хромосому, что соответствует модальному числу у *Lepidoptera*, *Rh. (W.) amasina* (из Турции) – 12 хромосом, *Rh. (Rh.) pruni* (из Крыма) – 47 [1, 2]. Последний вид, скорее всего, является полиплоидом [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Efetov K.A. A review of the western Palaearctic Procridinae (Lepidoptera: Zygaenidae). Simferopol: CSMU Press, 2001. 328 p.
2. Efetov K.A. Forester and Burnet Moths (Lepidoptera: Zygaenidae). The genera *Theresimima* Strand, 1917, *Rhagades* Wallengren, 1863, *Zygaenoprocris* Hampson, 1900, *Adscita* Retzius, 1783, *Jordanita* Verity, 1946 (Procridinae), and *Zygaena* Fabricius, 1775 (Zygaeninae). Simferopol: CSMU Press, 2004. 272 p.

АДАПТИВНАЯ СЕЛЕКЦИЯ САФЛОРА

Е.В. Картамышева¹, Т.Н. Лучкина¹, Л.П. Збраилова¹, Г.В. Бокий²

¹Донская опытная станция – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта», 346754, Российская Федерация, Ростовская обл., Азовский р-н, пос. Опорный, ул. Жданова, 2

²Ростовский государственный медицинский университет, 344022, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, Суворова, 119

E-mail: secretdos@ya.ru; gbokiy63@mail.ru

Сафлор (*Carthamus* L.) – род одно-, двух- или многолетних растений семейства астровых (*Asteraceae* Dumort.). Первоначально сафлор (*Carthamus tinctorius* L.) использовали в качестве красильного растения благодаря наличию красящего вещества в цветках – картамина, позже началась переработка семян на масло. Масло сафлора относится к полувысыхающим (йодное число 115–155) и по составу близко к подсолнечному. Применяется непосредственно в пищу при изготовлении маргарина, а также кремов и мазей, лаков и красок. В медицине используются противовоспалительные, антиоксидантные, обезболивающие и противодиабетические свойства сафлора. В связи с невысоким содержанием жира в семенах (20–35 %) культура не получила широкого распространения [1]. Вместе с тем, являясь одной из наиболее засухоустойчивых масличных культур, сафлор привлекает внимание производителей в аридных зонах земледелия. Помимо ярко выраженных ксерофитных признаков, отражающих приспособления к уменьшению транспирации, всходы в фазе розетки выдерживают заморозки до –15°C [2]. Высокая приспособленность к сухому континентальному климату позволяет получать в засушливые годы урожай маслосемян, превосходящие другие масличные культуры.

Исходный материал для селекции сафлора первоначально получен на основе коллекции ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова». Всего изучено 336 коллекционных номеров из 35 стран мира. Отбор проводили по фенеотипическим признакам: окраска венчика, форма листьев и листочков корзинки; высоте расположения нижних ветвей, а также по основным показателям продуктивности, засухоустойчивости и способности противостоять болезням и вредителям. Особое внимание привлекли коллекции из

Турции, Китая, Узбекистана, Туркмении, Австралии, Марокко и Венгрии, различающиеся по габитусу растений и основным хозяйственно ценным признакам. Вегетационный период изучаемых образцов варьировал от 69–104 (в засушливые годы с ГТК=0,21–0,55) до 100–122 суток (в годы с высокой влагообеспеченностью при ГТК=0,70–1,30). Высота растений составила 55–130 см. Урожайность семян находилась в пределах от 50 до 280 г/м², масличность – 15,2–35,6 %, масса 1000 семян – от 28 до 50 г.

Отбор элитных растений и самоопыление выделенных генотипов дало возможность стабилизировать их и использовать в дальнейшей работе. Методом шестикратного инцухтирования элитного растения, отобранного из коллекционного номера к-341, был получен новый сортообразец сафлора красильного, послуживший впоследствии основой скороспелого сорта Алмаз [3]. Сорт рекомендован к использованию не только в целях получения масла, но и сбора цветков (бесшипая форма), которые содержат картамин – ценный натуральный природный краситель превосходного качества, применяемый в пищевых целях и косметике. Декоративные качества сорта позволяют достойно использовать его в садоводстве и составлении букетов.

Проведение отборов наиболее ксероморфных генотипов (с наличием шипов на листьях обертки и корзинок), сочетающих высокую урожайность и масличность семян, позволило выделить продуктивные формы. На их основе путём гибридизации получен Г-622, из которого путём отборов с одновременным инцухтированием создан среднеспелый сорт Лидер. Потенциальная урожайность его семян достигает 2,6 т/га, масличность – 30–34 %. Сорт Лидер внесён в Государственный реестр селекционных достижений РФ с 2019 г. и допущен к использованию во всех регионах возделывания культуры. Высокая адаптивность сорта к условиям недостаточного увлажнения позволяет выращивать его в степных районах Ростовской, Волгоградской, Саратовской, Астраханской области и в Калмыкии. Привлекательность культуры в южных засушливых зонах Уральского и Сибирского федеральных округов, обусловленная её устойчивостью к заморозкам [4], позволяет рекомендовать новый сорт в данных регионах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Картамышева Е.В., Лучкина Т.Н., Гаврилова В.А.* // Идеи Н.И. Вавилова в современном мире: Мат-лы IV Вавиловской междунар. науч. конф., г. Санкт-Петербург, 20–24 ноября 2017 г. СПб.: НЦ РАН, 2017. С. 260–261.
2. Адаптивная технология возделывания сафлора в условиях Саратовской области: Рекомендации производству / Сост. Н.М. Ружейникова, Н.Н. Кулева, А.Н. Зайцев. Саратов, 2012. 30 с.
3. *Картамышева Е.В., Кондаурова В.Е., Лучкина Т.Н. и др.* // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. 2018. № 6. С. 41–44.
4. *Лукомец В.М., Зеленцов С.В., Кривошлыков К.М.* // Масличные культуры. Научно-техн. бюлл. ВНИИМК. 2015. Вып. 4 (164). С. 81–102.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ У ХЛОРОФИЛЛ-ДЕФИЦИТНЫХ МУТАНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ВНЕЯДЕРНЫМ ТИПОМ НАСЛЕДОВАНИЯ

А.А. Ковалевич, М.С. Макаренко, А.В. Усатов

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского Южного федерального университета,
344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: nightmare9606@gmail.com, usatova@mail.ru, mcmakarenko@yandex.ru*

Мутанты всегда представляли эффективные модели для изучения проблемы «ген–признак». В этой связи растения с хлорофильными мутациями являются классическим объектом изучения молекулярных механизмов биогенеза фотосинтетического аппарата и хлоропластов. Большинство

такого рода исследований проводят на жизнеспособных мутантах с желто-зеленой окраской листьев, типа *chlorina*. В данном исследовании мы использовали уникальную генетическую модель, включающую исходную инбредную линию 3629 подсолнечника с нормальным, зелёным фенотипом и несколько линий хлорофилл дефицитных (жёлто-зелёный фенотип (*chlorina*)) мутантов, полученных путём индуцированного N-нитрозо-N-метилмочевинной мутагенеза. Ранее гибридологическим анализом был продемонстрирован для линий *en:chlorina-1, -2, -6, -7, -8* внеядерный тип наследования мутантного фенотипа [1]. Подавляющее число работ в области генетики фотосинтеза базируются на исследованиях ядерных хлорофильных мутаций. Внеядерные хлорофильные мутации представлены в литературе значительно скромнее. В связи с этим целью исследования является сравнительный анализ уровня транскрипционной активности хлоропластных генов у внеядерных хлорофильных мутантов подсолнечника. Объектами нашего исследования служили растения подсолнечника (*Helianthus annuus*): исходной инбредной линии 3629, а также мутантные линии *en:chlorina - 1, -2, -6, -7, -8*, с различной степенью выраженности хлорофильной недостаточности. Методом количественной ПЦР была исследована экспрессия генов: *atpA, ndhA, psaA, psaB, psbA, psbB, rbcL, rpl36, rpoB, ucf2*. В качестве референсных генов при анализе уровня относительной экспрессии использовали *rpl36, rpoB*.

В результате исследования показано, что уровень относительной экспрессии генов *atpA, ndhA, psbA, psbB, rbcL* у всех исследуемых мутантных линий не имел значимых отличий по сравнению с контролем – линия 3629. Интересно отметить, что в более раннем исследовании нами у линии *en:chlorina-7* были локализованы несинонимичные мутации в хлоропластных генах *psaA* и *psbB*, при этом различия в транскрипционной активности этих генов не было обнаружено. Предположительно эти мутации влияют на фенотипическое выражение хлорофильной недостаточности на уровне трансляции. У других мутантов *en:chlorina-1* и *en:chlorina-6* был повышен уровень экспрессии гена *psaA* по сравнению с контролем в 4 и 2,5 раза, соответственно, а уровень экспрессии гена *psaB* – в 4,9 и в 2,6 раза. Уровень экспрессии гена *ucf2* у контрольных зелёных растений 3629 и мутантов (*en:chlorina-1, en:chlorina-2, en:chlorina-8*) был сходен, а у мутантов *en:chlorina-6, en:chlorina-7* обнаружено сниженное содержание транскриптов мРНК гена *ucf2* по сравнению с контролем в 3,7 и 6,1 раз, соответственно. Функция гена *ucf2* до сих пор полностью не ясна [2], однако показано, что он играет важную роль в процессе сборки реакционных центров фотосистем [3].

Таким образом, исследовав относительную экспрессию хлоропластных генов у внеядерных хлорофильных мутантов подсолнечника, было установлено, что по сравнению с исходной, зелёной линией 3629 у внеядерных хлорофилл дефицитных мутантов обнаружена повышенная экспрессия гена *psaA* в 4 раза у *en:chlorina-1* и в 2,5 раза у *en:chlorina-6* и гена *psaB* в 4,9 раз у *en:chlorina-1* и в 2,6 раз у *en:chlorina-6*. Отмечено также снижение экспрессии гена *ucf2* в 3,7 раза у *en:chlorina-6* и в 6,1 раз у *en:chlorina-7*. Достоверных различий в уровне транскрипционной активности других исследуемых генов у мутантных растений не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усатов А.В., Колоколова Н.С., Усатова О.А. и др. // «Живые и биокосные системы». 2013. № 3 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-3/article-20>
2. Bock R. Cell and Molecular Biology of Plastids. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2007. 534 p
3. Nevill P.G., Howell K.A., Cross A.T. et al. // Genome Biology and Evolution. 2019. Vol. 11. № 2. P. 472–485.
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект №18-34-00659.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СОХРАНЕНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ВОЛЖСКО-КАСПИЙСКОГО РЫБОХОЗЯЙСТВЕННОГО БАССЕЙНА

Н.В. Козлова, Е.Г. Макарова, М.А., Барегамян, А.В. Мирзоян

Волжско-Каспийский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» («КаспНИРХ»), 414056, Российская Федерация, г. Астрахань, Савушкина, 1
E-mail: natali19_12@mail.ru; for.alissa2015@yandex.ru

Сохранение генофонда осетровых рыб в современных экологических условиях Волжско-Каспийского рыбохозяйственного бассейна является важной задачей. Основным источником формирования и поддержания запасов осетровых стало их искусственное воспроизводство. Особенно это касается белуги (*Huso huso*), численность которой в последние десятилетия снизилась до критически низкого уровня. На этом фоне отмечается и существенное снижение генетического разнообразия рыб. Одним из главных факторов интенсификации осетроводства является использование современных методов молекулярной генетики. На осетровых рыбоводных заводах в системе искусственного воспроизводства по причине дефицита производителей наблюдается использование близкородственных пар при скрещивании, что негативно влияет на качество потомства и структуру популяционного генофонда.

В производственных условиях научно-экспериментальной базы (НЭБ) «БИОС» Волжско-Каспийского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ») был проведён эксперимент по использованию криоконсервированной спермы для восстановления генофонда белуги. Работа состояла из нескольких этапов. Первым этапом являлся микросателлитный анализ самок белуги с НЭБ «БИОС» и криоконсервированных половых продуктов самцов из криобанка филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»). Далее на основе полученных результатов проведены расчёты коэффициентов генетического родства [1], рекомендованные рыбоведам для составления схем скрещивания. На третьем этапе осуществляли исследование потомства белуги посредством микросателлитного анализа, позволяющего отследить передачу аллельного набора от производителей к молоди.

Генетические образцы (фрагменты плавников рыб, криоконсервированную сперму) фиксировали в 95 %-ном этаноле с последующей перезаливкой. Молекулярно-генетические исследования проводили методами, описанными в литературе [2, 3].

В эксперименте использовали икру от трёх самок и криоконсервированные половые продукты четырёх самцов. Коэффициенты генетического родства производителей при скрещивании варьировали от 0,13 до 0,30.

Молекулярно-генетический анализ половых продуктов самцов из криобанка «ВНИИПРХ» позволил выявить аллели, утраченные у каспийской белуги в современных условиях. Посредством эксперимента на НЭБ «БИОС» у потомства были воспроизведены в геноме эти редкие аллели, что особенно актуально для сохранения разнообразия данного ценного вида осетровых рыб.

Исследование генетических показателей производителей и потомства показало преимущество у молоди в экспериментальных условиях гетерозиготных генотипов по исследованным локусам. У производителей средний индекс фиксации Райта, отражающий дефицит и избыток гетерозигот, характеризовался положительным значением ($F_{sr} = 0,050$), что свидетельствовало о недостатке гетерозигот. Анализ потомства белуги, полученного при оплодотворении криоконсервированной спермой, выявил отрицательные величины среднего индекса фиксации Райта ($F_{sr} = - 0,151$), что указывало на отсутствие дефицита гетерозигот. Подращенная молодь, полученная с использованием криоконсервированных половых продуктов самцов, характеризовалась более высоким уровнем гетерозиготности, чем производители.

Таким образом, впервые проведена экспериментальная работа по установлению целесообразности использования криоконсервированного материала самцов белуги для оплодотворения икры с возможностью зафиксировать утраченные аллели потомства, что особенно важно для сохранения и восстановления генофонда этого ценного вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методика генотипирования производителей и молоди осетровых видов рыб с целью проведения генетического мониторинга искусственного воспроизводства – М.: ВНИРО. 2012. 28 с.
2. Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N. // Mol. Ecology Notes. 2006. Vol. 6. P. 998–1002.
3. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1093–1105.

АССОЦИАТИВНЫЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА мтДНК С ПРОДУКТИВНЫМИ КАЧЕСТВАМИ СВИНЕЙ

М.А. Колосова^{1,2}, Л.В. Гетманцева³, Н.Ф. Бакоев³, А.Ю. Колосов²

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Донской государственный аграрный университет, 346493, Российская Федерация, пос. Персиановский, ул. Кривошлыкова, 24

³Всероссийский институт животноводства им. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, г. Подольск, пос. Дубровицы, 60

E-mail: m.leonovaa@mail.ru; ilonaluba@mail.ru; nekruz82@bk.ru; kolosov777@gmail.com

Митохондрии играют чрезвычайно важную роль в метаболических процессах, апоптозе и старении клеток [1]. Идентификация полиморфизмов мтДНК свиней имеет значение, так как эти мутации могут быть связаны с экономически важными признаками свиней. У свиней мтДНК представляет собой кольцевую молекулу, состоящую в среднем из 16,5 тыс. п.н. В состав мтДНК входят 37 генов: 13 для белков дыхательной цепи, 22 для тРНК и два рРНК (16S рРНК и 12S рРНК), а также наиболее варибельная область – D-петля. Ген мтДНК субъединицы II цитохромоксидазы (COXII) является одним из элементов комплекса IV дыхательной цепи и, таким образом играет ключевую роль в производстве энергии [2].

Целью данного исследования стала оценка ассоциативных связей полиморфизма гена COXII мтДНК с продуктивными качествами свиней. Исследование проводили на свиньях крупной белой породы в двух группах. Первая группа состояла из свиней крупной белой породы (КБ-1, $n=24$), разводимых в РФ с 1998 г. Во вторую группу были отобраны свиньи крупной белой породы импортной селекции (КБ-2, $n=24$), завезенные в 2014 г. в хозяйство РФ из Англии. Для оценки ассоциаций гаплотипов гена COXII с продуктивными качествами свиней КБ-1 выборку увеличили до 96 свиней. МтДНК выделяли набором «К-Сорб-100» (ООО «Синтол») в соответствии с инструкцией производителя. В качестве референсной была выбрана последовательность под номером NC_000845.1 (*Sus scrofa*), представленная в NCBI. Продуктивные качества оценивали по толщине шпика (BF) и среднесуточному приросту (ADG), измеренных при достижении 100 кг веса свиней. Анализ влияния полиморфизма гена COXII на продуктивные признаки свиней проводили с использованием смешанной линейной модели (LMM). Расчёт параметров LMM выполняли с использованием пакета lme4 языка R в среде R-studio.

В результате исследований была определена нуклеотидная последовательность гена COXII. В изучаемой выборке установлено три гаплотипа и девять нуклеотидных замен в позициях m.8292, m.8334, m.8419, m.8466, m.8526, m.8634, m.8664, m.8682, m.8682, m.8694. Установлены внутригрупповые различия у свиней отечественной селекции КБ-1, представленные Нар_1 и Нар_2, которые обусловлены заменами в восьми локусах: m.T8292C, m.T8334C, m.T8419C, m.T8526C, m.G8634A, m.G8664A, m.A8682G, m.T8694C, соответственно. Все животные из группы свиней импортной селекции КБ-2 имели только Нар_3.

Достоверность различий между показателями Y (BF и ADG), ассоциированными с гаплотипами COXII, оценивали с помощью LMM. Фиксированными факторами выступали Нар (Нар_1 и Нар_2 of

гена COXII) и год/сезон рождения животного (Year). Рандомизированным фактором был номер отца (1|Father). Использовали следующую модель (full_model): $Y \sim \text{Har} + \text{Year} + (1|\text{Father})$. Для оценки значимости фактора Har на признаки BF и ADG full_model сравнивали с null_model: $Y \sim 1 + \text{Year} + (1|\text{Father})$. Полученные результаты показали значимость фактора Har на толщину шпика (таблица).

Таблица

Показатели BF и ADG у свиней различных гаплотипов гена COXII

Показатели	Гаплотипы гена COXII		df	χ^2	P
	Har_1	Har_2			
BF	20,86 ± 1,02	24,01 ± 1,58	1	4,896	0,026
ADG	783,02 ± 22,43	764,02 ± 27,68	1	0,586	0,443

Проведённый анализ вариабельности гена COXII мтДНК показал наличие трёх гаплотипов у свиней крупной белой породы: Har_1 (TTTCTGGAT, в локусах m.8292, m.8334, m.8419, m.8466, m.8526, m.8634, m.8664, m.8682, m.8682, m.8694), Har_2 (CCCCAAGC) и Har_3 (TTTTTGGAT). Внутригрупповой полиморфизм установлен у свиней КБ-1 отечественной селекции, он представлен Har_1 и Har_2. Результаты ассоциативных исследований показали наличие связи вариантов гена COXII с меньшей толщиной шпика, характерной для свиней Har_1. Значимых различий по среднесуточным приростам свиней установлено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колосова М.А., Бакоев Н.Ф., Колосов А.Ю., Гетманцева Л.В. // Международный научно-исследовательский журнал. 2019. № 1–2 (79). С. 10–13.
2. Yang J., Wang J., Kijas J. et al. // J. Hered., 2003. Vol. 94 (5). P. 381–385.

Работа выполнена с использованием средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (договор №МК-1443.2018.11).

НАСЛЕДОВАНИЕ ОКРАСКИ ПЕРИКАРПА И ДРУГИХ ПРИЗНАКОВ РИСА

П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.В. Аксенов, Э.С. Балюкова

Аграрный научный центр «Донской», 347740, Российская Федерация, г. Зерноград, Научный городок, 3
E-mail: p-kostylev@mail.ru

Большинство сортов риса формируют зерна с белым перикарпом, но некоторые имеют красные, коричневые или чёрные. Перикарп цветных рисовых зёрен накапливает проантоцианидин (красный рис) или антоциан (чёрный рис). Эти вещества обладают антиоксидантной активностью и полезны людям с большим сердцем, диабетом, повышенным риском раковых заболеваний. Для чёрной пигментации необходимы два гена: пурпурный перикарп A (Pp), расположенный на хромосоме 1 и пурпурный перикарп B (Pb), расположенный на хромосоме 4. Сочетание двух доминантных комплементарных генов Pb_Pp даёт фиолетовый цвет околоплодника риса, Pb_pppp – коричневый, тогда как pbrbPp_ или pbrbpppp – белый. Интенсивность фиолетового цвета зависит от количества доминантных аллелей Pp на хромосоме 1 [1]. Во ВНИИ риса выведены чёрнозёрные сорта Мавр, Гагат, Южная ночь [2]. В АНЦ «Донской» работа только начинается, поэтому анализ наследования признаков у гибридов между бело- и чёрнозёрными сортами актуален.

Целью работы являлось создание новых линий риса с чёрным околоплодником. Задачи – подбор исходных сортов с нужными генами, гибридизация для их объединения в одном генотипе, генетиче-

ский анализ варьирующих количественных признаков и отбор лучших рекомбинантных форм, сочетающих в себе компактную прямостоячую метёлку и чёрное зерно.

Материалом исследования послужили гибридные растения второго поколения от скрещивания сортов Светлый и Мавр. Сорт Светлый селекции АНЦ «Донской» имеет компактную прямостоячую метёлку длиной 14 см, с длинными зерновками ($l/b - 3,0$). Стекловидность 85–90 %. Сорт Мавр выведен во ВНИИ риса, растения короткостебельные, с длинной поникающей метёлкой (18 см) с овальными зернами ($l/b - 2,5$). Перикарп зерновки – тёмно-фиолетовый, почти чёрный. Стекловидность 75–78 %. Исследования проводили в 2018 г. на полях Опытной станции «Пролетарская» в Ростовской области. При закладке опытов руководствовались методикой полевого опыта [3]. Для генетического анализа использовали компьютерную программу Полиген А [4].

В наших исследованиях при скрещивании белозёрного сорта Светлый с чёрнозёрным сортом Мавр в F_1 формировалось чёрное зерно. Второе поколение расщепилось на три типа окраски, среди которых появилась коричневая. У 428 проанализированных растений чёрная окраска перикарпа была выявлена у 235, коричневая – у 83, белая – у 110 (табл.). Различия между родительскими сортами заключались в аллельном состоянии генов Pb и Pp , у Светлого генная формула – $pbpbpppp$, у Мавра – $PbPbPpPp$, причем доминантные гены определяли окраску зерна.

Таблица

Наследование окраски зерна у гибрида F_2 Светлый × Мавр (2018 г.)

Окраска зерна	Генная формула	Расщепление		Доля генотипа
		фактическое	теоретическое	
Черная	$Pb Pp$	235	240,75	9
Коричневая	$Pb pppp$	83	80,25	3
Белая	$pbpbPp$ и $pbpbpppp$	110	107,0	4
Сумма:		428	428	16

$$\chi^2 = 0,32; 0,80 < p < 0,90$$

Расщепление проходило по дигибридной схеме по типу рецессивного эпистаза в соотношении 9:3:4. Черная окраска перикарпа формировалась при наличии в генотипе двух доминантных генов Pb и Pp , коричневая определялась геном Pb , белая – остальными комбинациями генов. По-видимому, третий ген в хромосоме 3, о котором сообщалось в работе [5], у обоих сортов находился в доминантном состоянии.

Наследование признака «высота растения» происходило по типу сверхдоминирования больших значений признака ($h_p=3,09$) с различиями по аллельному состоянию двух пар генов, что привело к расщеплению 7:9 и появлению положительных трансгрессий. По длине метёлки наблюдалось частичное отрицательное доминирование и моногенные различия скрещенных сортов, расщепление 3:1. Сила гена составила 4,8 см. По числу колосков на метелке установлено сверхдоминирование большей величины признака и взаимодействие двух пар генов, причём у каждой родительской формы были и рецессивные, и доминантные аллели, но в разных локусах. По массе 1000 зёрен установлено частичное доминирование больших значений признака, расщепление 1:2:1 и моногенные различия. Сила гена – 3,4 г.

Были выделены формы, сочетающие оптимальную высоту растения, повышенную озерённость и оптимальную массу 1000 зёрен, а также чёрную окраску перикарпа. Эти формы были посеяны на третье поколение в гибридном питомнике для дальнейшего изучения и отбора лучших линий с чёрным перикарпом зерновки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rahman M.M., Lee K.E., Kang S.G. // Indian J. Genet. 2015. № 75 (4). P. 426–433.
2. Гончарова Ю.К., Бушман Н.Ю., Верещагина С.А. // Рисоводство. 2015. № 1–2 (26–27). С. 9–11.
3. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

4. Мережко А.Ф. // Экологическая генетика культурных растений: Мат-лы школы молодых ученых РАСХН, ВНИИ риса. Краснодар, 2005. С. 107–117.
5. Maeda H., Yamaguchi T., Omoteno M., et al. // Breed Sci. 2014. 64(2). P. 134–141.

ПОИСК СВЯЗИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПРОИСХОЖДЕНИЕМ

И.В. Лазебная¹, Ю.А. Столповский¹, О.Е. Лазебный²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, ГСП-1, Российская Федерация, г. Москва, ул. Губкина, 3

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: Lazebnaya@mail.ru; stolpovsky@mail.ru; oelazebny@gmail.com

Реконструкция происхождения видов является одной из интересных и актуальных задач, решение которой традиционно осуществляется молекулярно-генетическими методами. Главным образом, оценивают материнский и отцовский вклад в дивергенцию от предковой формы на основе исследования митохондриального генома и микросателлитов Y-хромосомы, соответственно [1]. Кроме того, для этих целей изучают изменчивость микросателлитов аутосом и межмикросателлитных локусов [2, 3]. В отношении внутривидовых групп животных, например пород домашних животных, в последние годы широко используют анализ SNP, который в ряде случаев даёт возможность различить породы [4, 5]. Это касается, в том числе и аборигенных пород, не подвергавшихся значительному искусственному отбору, что в отдельных случаях связано с потерей адаптивных качеств в результате их скрещивания с породами мировой селекции. Известно, что ген *BOLA-DRB3* является важным маркером устойчивости к целому спектру вирусных и бактериальных заболеваний, определяет адаптационные возможности организма, при этом он характеризуется наибольшим уровнем полиморфизма среди генов главного комплекса гистосовместимости, и насчитывает порядка 130 аллелей у крупного рогатого скота обоих подвидов, *Bos taurus* и *B. indicus*.

Нашей целью являлось исследование возможности использования полиморфизма гена *BOLA-DRB3* главного комплекса гистосовместимости для дифференциации пород разного происхождения на примере ряда азиатских и европейских пород.

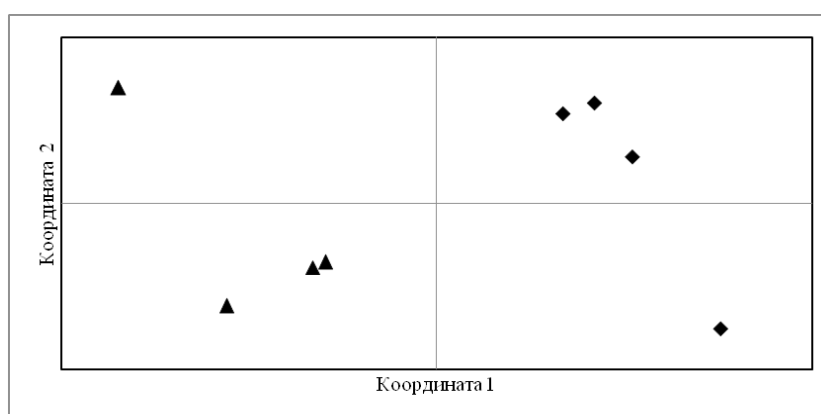


Рис. Ординация пород азиатского и европейского происхождения в проекции первой и второй главных координат. Треугольниками обозначены породы европейского происхождения, ромбами – азиатского.

Анализ собственных данных и привлечённого материала методом главных компонент показал формирование двух групп пород, азиатской и европейской, что отражено на рисунке. Разброс пород в каждой группе примерно одинаков, как по первой, так и по второй компонентам. При этом внутри каждой группы среднее расстояние между её членами менее расстояния между группами. Результат АМОВА также свидетельствует о значительной внутригрупповой изменчивости, которая в каждой группе индивидуальна и не перекрывается, за счёт чего межгрупповая изменчивость превосходит внутригрупповую и позволяет дифференцировать исследованные азиатские и евразийские породы друг от друга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Edwards C.J., Baird J.F., Machugh D.E. // *Animal Genetics*. 2007. Vol. 38. P. 520–524.
2. Sharma R., Kishore A., Mukesh M. et al. // *BMC Genetics*. 2015. Vol. 16. P. 1–13. Doi:10.1186/s12863-015-0221-0.
3. Столповский Ю.А., Лазебный О.Е., Столповский К.Ю., Сулимова Г.Е. // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 6. С. 825–833.
4. Lazebnaya I.V., Lazebny O.E., Khatami S.R., Sulimova G.E. Use of the Bovine Prolactin Gene (bPRL) for Estimating Genetic Variation and Milk Production in Aboriginal Russian Breeds of *Bos taurus* L. // *Prolactin / G.M. Nagy. InTech*, 2013.
5. Lazebnaya I.V., Perchun A.V., Lhasaranov B.B. // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018. Vol. 22, № 6. P. 734–741.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ОДНОЛЕТНИХ ВИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Н.В. Маркин, Е.В. Доценко, Н.С. Колоколова, К.Ф. Кан, А.В. Усатов

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: nmarkin@mail.ru*

Одной из фундаментальных и прикладных задач генетики растений является изучение изменчивости их геномов. Используя эти знания, становится возможным определение генетического разнообразия и родства различных видов растений, а также разработка генетических паспортов сельскохозяйственных и коллекционных образцов [1]. Наиболее эффективный и простой метод оценки генетического полиморфизма основан на технологии ПЦР с определением специфичных молекулярных маркеров.

Целью настоящей работы является генотипирование образцов однолетних видов подсолнечника с использованием микросателлитных маркеров. В работе использовали 19 образцов дикорастущих однолетних видов подсолнечника различных номеров интродукции, включающих пять видов: *Helianthus annuus*, *Helianthus petiolaris*, *Helianthus debilis*, *Helianthus praecox*, *Helianthus agrophyllus* и один селекционный образец *H. annuus* ВИР 119 из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.

В базе данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=4232&query=Helianthus) всего были отобраны 52 SSR-маркера, локализованные во всех 17 группах сцепления (хромосом) генома подсолнечника.

Геномную ДНК выделяли из высечки листовой ткани подсолнечника сорбентным методом с помощью набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол). Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НCl, pH 8,8; 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgSO₄, 0,1 мМ меркаптоэтанола, 0,25 мМ каждого ДНТФ, по 20 пМ праймеров; 2,5 ед. Taq-полимеразы, 15 нг выделенной ДНК. Реакцию амплификации проводили в термоциклере Palm Cyclor (Corbett Research,

Австралия) по программе: один цикл: 4 мин. 94 °С; 35 циклов: 20 с 94 °С, 20 с 58 °С, 1 мин. 72 °С; один цикл: 10 мин 72 °С. Продукты реакции амплификации разделяли электрофоретически в 3 %-ном агарозном геле с бромистым этидием (1 мкг/мл), используя трис-боратный буфер. После окончания электрофореза гели переносили на трансиллюминатор и результаты фотодокументировали. В качестве маркера молекулярной массы использовали набор GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

В результате проведённого молекулярно-генетического анализа 20 образцов однолетних видов подсолнечника из отобранных 52 SSR-маркеров 47 проявили себя как хорошо воспроизводимые и информативно значимые. Для каждого образца были получены индивидуальные SSR-спектры. Определены 200 аллельных вариантов исследованных маркеров. Отмечены различия амплифицированных фрагментов в агарозном геле между исследуемыми образцами: 1) по подвижности; 2) присутствию/отсутствию фрагментов ДНК и 3) мультилокусности. Оценка распределения аллелей изученных микросателлитов позволила установить генетический полиморфизм однолетних видов подсолнечника, что свидетельствует о высокой эффективности метода SSR-генотипирования. Значения информационного полиморфизма SSR-маркеров варьировали от 0,25 до 0,95.

UPGMA-дендрограмма, построенная на основании полученных данных, продемонстрировала разделение исследованных образцов на два кластера. Первый кластер включает все образцы вида *H. annuus*, в том числе и образец линии ВИР 119, а второй – все образцы остальных однолетних видов подсолнечника. Дискриминационный потенциал изученной маркерной системы для идентификации образцов подсолнечника оказался достаточно высоким и является пригодным для их паспортизации. Данные по распределению аллелей SSR-локусов у исследованных образцов подсолнечника представляют собой базу данных, которая может быть использована для контроля уровня генетического полиморфизма коллекционных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Markin N.V., Usatov A.V., Vasilenko V.N. et al. // Am. J. Agric. Biol. Sci. 2016. Vol. 11. № 1. P.13–18. DOI :10.3844/ajabssp.2016.13.18

Результаты получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект № 6.929.2017/4.6, на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» Южного федерального университета.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ И РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ *Syringa vulgaris* L.

Л.В. Новоселова¹, С.Н. Жакова², А.С. Чугайнова¹

¹*Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, Российская Федерация, г. Пермь, ул. Букирева, 15*

²*Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова», 614990, Российская Федерация, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23
E-mail: novoselova@psu.ru; zhakova@pgsha.ru*

Изучение генетических ресурсов – многоэтапный процесс, в котором особое место занимает исследование репродуктивной биологии, изучающей различные аспекты семенного размножения. С учётом эмбриологических сведений на основе синтеза всех данных, полученных с помощью разных методов и подходов, можно выявить не только закономерности индивидуального развития, особенности воспроизведения и размножения растений, но и наметить признаки, которые могли бы быть использованы для целей селекции. Проведено исследование, направленное на выявление

признаков соцветий, эмбриологических структур и процессов на основе сравнительного анализа шести видов, двух межвидовых гибридов и 11 сортов рода *Syringa* L. из семейства OLEACEAE.

Проанализированы особенности биологии цветения и опыления (строение и развитие генеративных почек, соцветий и цветков, цветение, опыление); эмбриологические характеристики (формирование органов цветка, микро- и мегаспорогенез, развитие мужского и женского гаметофитов, оплодотворение, эмбриогенез и эндоспермогенез); аспекты семенной продуктивности, плодозавязываемость. Изученные виды и сорта относятся к двум секциям подрода *Syringa*: секции *Syringa* L. (*S. vulgaris* L.) и секции *Villosae* C.K. Schneid. (*S. josikaea* J. Jacq. ex Rchb., *S. emodi* Wall. ex Royle, *S. wolfii* C.K. Schneid., *S. sweginzowii* Koehne & Lingelsh., *S. villosa* Vahl, *S. × prestoniae* McKelvey (*S. komarowii* subsp. *reflexa* × *S. villosa* (гибрид Престон)), *S. × henryi* C.K. Schneid. (*S. josikaea* × *S. villosa* (гибрид Генри)). Дана их ботаническая характеристика с указанием географического и гибридного происхождения, а также места и года поступления в коллекцию сирингария Учебного ботанического сада имени А.Г. Генкеля Пермского государственного национального исследовательского университета.

Особый интерес представляют данные по развитию и строению эмбриологических структур. Прежде всего исследуемые виды и гибриды *Syringa* характеризуются сходным развитием мужской генеративной сферы. Сформированная стенка микроспорангия у большинства видов 4-слойная и представлена эпидермисом, эндотецием, средним слоем и секреторным тапетумом. У некоторых видов образуется два (*S. sweginzowii*), либо четыре (*S. vulgaris*, несортная сирень) средних слоя. В морфологии пыльцевых зёрен исследуемых таксонов не выявлены существенные различия: пыльцевые зерна 3-бороздно-поровые, округлые, с сетчатой скульптурой мезокольпиума. Хотя обнаружены стерильные пыльцевые зерна, имеющие меньшие размеры. У большей части изученных растений фертильность пыльцы составляет более 50 %. При исследовании женских репродуктивных структур *Syringa* выявлены черты сходства для большинства видов. Это проявляется в строении гинецея (синкарпный, завязь верхняя, двугнездная), семязачатков (анатропные, тенуинуцеллятные, с интегументальным тапетумом). Археспориальная клетка без отделения париетальной клетки преобразуется в мегаспороцит. Особенностью процесса мегаспорогенеза является образование одинаковых по размеру мегаспор в линейной тетраде. Зародышевый мешок формируется из халазальной мегаспоры по *Polygonum*-типу. Зрелый зародышевый мешок состоит из типичных клеток, за исключением *S. sweginzowii* и *S. vulgaris*, у которых клетки на микропилярном и антиподальном полюсах имеют сходную дифференциацию. Изучено соотношение в развитии мужских и женских репродуктивных структур. Выявлено одновременное развитие репродуктивных структур, особенно в период цветения, что является основой диогогамии. Однако у большинства образцов тычиночная и рыльцевая фазы цветка совпадают, что не исключает автогамию при наличии самосовместимости.

Одной из задач исследования было изучение эффективности плодотворения в условиях свободного опыления. Изученные виды, гибриды и сорта *Syringa* характеризуются достаточно высокими значениями потенциального плодотворения. Оказалось, что степень реализации репродуктивного потенциала, как правило, невысока и составляет несколько процентов, как у сортов *S. vulgaris*. Причинами неполной реализации репродуктивного потенциала *Syringa* могут быть недостаточность опыления, нарушения в развитии репродуктивных структур, качество пыльцевых зёрен, а также специфика условий места произрастания. Многие ценные сорта *Syringa vulgaris* представлены единичными экземплярами. Данная ситуация значительно повышает риск потери уникальных генотипов. Одним из быстрых способов вегетативного размножения является микроклональное размножение. Разработаны элементы технологии микроклонального размножения *Syringa vulgaris* на примере четырёх сортов 'Sensation', 'Congo', 'Лебедушка', 'Минчанка', которые позволяют успешно решать на этапе введения в культуру такие проблемы, как высокий процент контаминации, чрезмерное каллусообразование и др.

СОЗДАНИЕ РЕСУРСНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОВЕЦ ДЛЯ КАРТИРОВАНИЯ QTL, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СКОРОСТЬЮ РОСТА КАК НОВЫЙ ЭТАП ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОВЕЦ В РОССИИ

С.Н. Петров, Т.Е. Денискова, А.В. Доцев, М.С. Форнара, И.В. Гусев, Н.А. Зиновьева

*Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60
E-mail: citelekle@gmail.com; horarka@yandex.ru*

Выявление генетических вариантов, определяющих формирование желательного фенотипического проявления экономически полезных признаков, является актуальной задачей современной генетики сельскохозяйственных животных. Интенсивность роста как продуктивный признак вызывает повышенный интерес со стороны российского овцеводства, который обусловлен, прежде всего, отсутствием специализированных скороспелых пород овец в России. Наиболее перспективным и эффективным методом совершенствования животных является тестирование по ДНК-маркерам. Тем не менее поисковые работы по идентификации локусов количественных признаков (QTL) и генов-кандидатов, связанных с повышенной скоростью роста у овец, представлены ограниченным количеством исследований, основанных на данных генотипирования с помощью ДНК-чипов средней плотности (~ 50 000 SNPs) в случайных выборках [1–5]. В связи с этим целью нашего исследования является картирование QTL, ассоциированных со скоростью роста, на основе данных генотипирования овец из специально заложенной ресурсной популяции. Ресурсная популяция овец была получена в результате серии межпородных скрещиваний пород с контрастным проявлением изучаемого признака и в настоящее время представлена родительскими формами, в том числе баранами породы катадин ($n=2$) и матками романовской породы ($n=16$), и двумя генерациями экспериментальных гибридных овец: F1 ($n=20$) и возвратные кроссы BC ($n=45$). Использование ресурсной популяции, помимо увеличения точности картирования QTL, даёт возможность формирования надёжной базы фенотипической изменчивости у экспериментальных овец, которая является необходимым условием для проведения GWAS. Для генотипирования животных был применен ДНК-чип Ovine Infinium® HD SNP BeadChip (Illumina, San Diego, CA) с высоким покрытием генома (~ 600 000 SNPs). Качество кластеризации генотипов оценивалось в GenomeStudio 2; фильтрация SNPs осуществлялась в PLINK v1.09. Проведённые анализы, в том числе MDS-, адмикс и построение генетических сетей, показали дифференциацию двух генераций экспериментальных овец.

В настоящее время база фенотипической вариабельности девяти промеров туловища и живой массы включает данные в динамике 6, 42, 90, 180 и 270 дней для первой генерации, в динамике 6, 42 и 90 дней для второй генерации и для группы сравнения (чистопородные баранчики романовской породы). Возвратные кроссы превосходили своих сверстников из группы сравнения по большинству показателей роста и развития в анализируемые интервалы времени (6, 42 и 90 дней), в том числе у баранчиков отмечалось статистически достоверное превышение на 2,93 см по глубине груди в возрасте 90 дней (уровень значимости $p<0,05$).

После снятия промеров туловища и определения живой массы в старшие возрастные периоды для второй генерации мы приступим к выполнению следующего этапа исследования, а именно: к идентификации генов-кандидатов, вовлечённых в формирование скороспелости у овец, на основе GWAS для внедрения в рутинное тестирование животных, вовлечённых в селекционный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jonas E., Thomson P.C., Raadma H.W. // In Proceeding of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig. 2010.

2. Riggio V., Matika O., Pong-Wong R. et al. // *Heredity* (Edinb). 2013. Vol. 110. P. 420–429.
3. Zhang L, Liu J., Zhao F. et al. // *PLoS One*. 2013. Vol. 10, № 6. P. e0128688.
4. Al-Mamun H.A., Kwan P, Clark S.A. et al. // *Genet. Sel. Evol.* 2015. Vol. 47, № 1. P. 66.
5. Kominakis A., Hager-Theodorides A.L., Zoidis E. et al. // *Genet. Sel. Evol.* 2017. Vol. 49. P. 41.

Благодарим ООО СХП «Катумы» за предоставление баранов породы катадин для проведения скрещиваний. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08015.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНА АМЕЛОГЕНИНА: ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ У ВИДОВ СЕМЕЙСТВА ПОЛОРОГИЕ

С.Н. Петров, В.Р. Харзинова, О.В. Костюнина, А.В. Доцев, Н.А. Зиновьева

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, Московская обл., Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60

E-mail: citelekle@gmail.com; veronika0784@mail.ru; kostolan@mail.ru; asnd@mail.ru; zinovieva@mail.ru

Современная сельскохозяйственная наука пользуется не только ставшими уже классическими методами оценки фенотипической изменчивости исследуемых пород животных, но и разнообразными генетическими подходами, находящими всё более широкое практическое применение и позволяющими быстро получить необходимые результаты. Точное определение половой принадлежности животных [1–5], зачастую, необходимо для более объективной интерпретации результатов молекулярно-генетических исследований. Сложности, возникающие при отборе проб от диких животных, приводят к тому, что в качестве исходного материала для исследований находят широкое применение неинвазивные пробы (волосы, экскременты) [6], которые могут быть найдены и собраны в местах обитания изучаемых видов и являются анонимными.

Ген амелогенина – это наиболее популярный ДНК-маркер для определения пола как у диких, так и домашних видов животных, так как варианты данного гена, расположенные на X- и Y-хромосомах, чётко различаются по длине фрагмента. В связи с этим целью нашей работы стало создание тест-системы на основе анализа полиморфизма гена амелогенина для установления пола у разнообразных видов домашних и диких животных семейства Полорогие (*Bovidae*), в том числе *Bos* (n=4), *Bison* (n=16), *Ovis* (n=38), *Capra* (n=65), *Rupicapra* (n=10), *Tragelaphus* (n=2), *Pseudois* (n=2) и *Hemitragus* (n=2).

Теоретической основой настоящей работы послужили рекомендации международного общества генетики животных (ISAG) по маркерам для определения пола и нуклеотидные последовательности гена амелогенина, загруженные в генный банк NCBI. Для амплификации фрагмента гена амелогенина была подобрана пара праймеров: прямой SE47 (5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3') и обратный SE48 (5'-CCCGCTTGGCTTGTCTGTTGC-3'), фланкирующие участок со специфической для Y-хромосомы делецией. Результат может быть получен в двух режимах детекции: визуализация полученных ампликонов посредством гель-электрофореза в агарозном геле и лазерное разделение образующихся фрагментов на капиллярном ДНК-анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США). При анализе полученных данных были идентифицированы различия в длинах фрагментов для X и Y-хромосом у самцов и самок всех исследованных видов. Кроме того, были установлены различия аллельных вариантов гена амелогенина у самок и самцов диких и домашних видов семейства полорогих. Длины фрагментов, специфических для X-хромосомы, в зависимости от вида животных, составили 264 или 280 п.о., для Y-хромосомы – 202 или 217 п.о. Внедрение маркера гена амелогенина (AMEL) в

мультиплексные микросателлитные панели позволяет автоматически устанавливать (для диких видов) и подтверждать (для сельскохозяйственных видов) пол животного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weikard R., Pitra C., Kühn C. // Mol. Reprod. Dev., 2006. Vol. 73, P. 1333–1337.
2. Pfeiffer I, Brenig B. // BMC. 2005. Genetics. Vol. 6. P. 16.
3. Ennis S., Gallagher T.F. // Anim. Genet. 25. Vol. 1994. P. 425–427.
4. Pajares G., Alvarez I., Fernandez I. et al. // Arch. Tierz. Dummerstorf. 2007. Vol. 50 (5). P. 442–446.
5. Sasaki S., Shimokawa H. // Int. J. Dev. Biol. 1995. Vol. 39. P. 127–133.
6. Yamauchi, K., Hamasaki S.I., Miyazaki K. et al. // J. Vet. Med. Sci. SO. 2000. Vol. 62 (6). P. 669–671.

Работа была проведена в рамках выполнения государственного задания № АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ МЕЖДУ ДВУМЯ ПОРОДНЫМИ ГРУППАМИ ДОМАШНЕГО КАРПА (*Cyprinus carpio*)

С.М. Расторгуев¹, А.А. Волков², Г.М. Шалгимбаева³

¹Национальный научный центр «Курчатowski институт», 123182, Российская Федерация, г. Москва, пл. Курчатова, 1

²Всероссийский Научно-Исследовательский институт Рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), 107140, Российская Федерация, г. Москва, ул. В. Красносельская, 17

³ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства», 050016, Республика Казахстан, г. Алматы, пр. Суюнбая, 89 «А»

E-mail: rastorgueff@gmail.com; alexavolkov@gmail.com; shalgimbayeva@mail.ru

Домашний карп – *Cyprinus carpio* – занимает третье место в мире (после белого амура и толстолобика) и первое место в России по аквакультурному производству. По данным FAO (Food and Agriculture organization of the United Nations, www.fao.org) в 2017 г. в мире было произведено более 4 млн т карпа в аквакультуре и более 110 тыс. т выловлено из окружающей среды. При этом наблюдается устойчивый рост аквакультурного производства карпа.

В мировой аквакультуре насчитывается более 35 пород домашнего карпа, большая часть из них была получена в центральной и восточной Европе, где этот вид культивировали, начиная со средних веков. В Советском Союзе в 30-х годах прошлого века были начаты работы по селекции холодоустойчивых пород карпа методом гибридизации европейских пород карпа с Амурским сазаном (*C. carpio haematopterus*) – диким холодоустойчивым видом, обитающим на Дальнем Востоке. Результатом этой селекции стали несколько отечественных пород, отличающихся устойчивостью к более холодным климатическим условиям центральной части России.

Ранее, генетические исследования европейских и отечественных пород карпа проводили с использованием ограниченного количества генетических маркеров (к тому же не позволяющих функциональную интерпретацию полученных данных) – таких как: отдельные участки мтДНК, RAPD-маркеры и микросателлитные локусы. Подобные исследования не позволяли с достаточной надёжностью разделять между собой отдельные породы и породные группы.

В нашей работе мы исследовали 68 образцов из 13 разных домашних пород и диких популяций карпа методом ddRAD, который, используя новые технологии секвенирования (NGS), позволяет получать большое количество генетической информации в масштабах целых геномов для относительно большого количества образцов исследования. Всего нами было найдено 98 2827 полиморфных локусов в 68 образцах, принадлежащих четырём отечественным, пяти европейским породам карпа и четырём диким популяциям сазана. После фильтрации с использованием различных параметров мы оставили

65 686 локусов. Было показано, что, несмотря на то, что исследуемые породы и породные группы имеют специфические генетические различия между собой, количество маркеров, необходимых для разделения этих групп очень велико, так как вклад каждого маркера (локуса) очень мал – медианное значение дискриминационной способности составило около 0,1 % а максимальное – 0,65 %.

Количество SNP локусов, в которых аллельные частоты статистически значимо отличались между европейской и отечественной породными группами, равнялось 2 618, а количество генов, в которых эти локусы находились, достигло 865.

Нами были определены генные категории, обогащённые в полученном списке генов, и проведён функциональный анализ дифференцирующих генов. Было показано, что различия чаще находятся в генах, кодирующих белки, отвечающие за моторную активность, ГТФазах и генах белков, взаимодействующих с микротрубочками. Также мы определили генетический вклад амурского сазана в некоторые породы домашних карпов.

ГОМОЛОГ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИЗ *Triticum kiharae*

Б.В. Романов¹, А.С. Азаров²

¹Федеральный Ростовский аграрный научный центр, 346735, Российская Федерация, Ростовская обл., Аксайский район, пос. Рассвет, Институтская 1,

²Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

E-mail: triticumrbw@mail.ru; bioclon@list.ru

Развитие рода *Triticum* шло по пути как появления видов-гомологов в двух гомологичных подродах, так и становления видов-аналогов внутри каждого из подродов. Виды-гомологи имеют разный качественный геномный состав, одинаковый уровень пloidности и сходные хозяйственные особенности [1]. Ранее нами было показано, что созданная как гомолог мягкой пшеницы *T. aestivum* AⁿBD по второй филогенетической ветви *T. miguschovae* A^bGD не является в полном смысле таковым, поскольку в её продукционных признаках, в отличие от мягкой пшеницы, не реализуется вклад одного из трёх её элементарных диплоидных геномов. Поэтому его коэффициент удельной продуктивности (Куп-соотношение зерна колоса к вегетативной части побега) на 1/3 ниже, чем у мягкой пшеницы [2]. Более того, *T. miguschovae* существенно отличалась от настоящей *T. aestivum* фенотипически, тогда как полная гомология подразумевает одинаковый или близкий фенотипический эффект [3]. В то же время полученный с использованием супермутагена N-НММ полный гомолог мягкой пшеницы имел феноменальное сходство с истинными образцами мягкой пшеницы, и его происхождение из *T. kiharae* пришлось подтверждать при помощи иммунохимических и электрофоретических анализов [4]. Учитывая вышеизложенное, предпринята попытка ресинтеза гомолога мягкой пшеницы из *T. kiharae* с использованием более дешёвого и доступного препарата колхицина. В результате в С₃ среди обработанных растений было обнаружено растение с «голубой» окраской или сизым восковым налётом. Из дозревших колосьев этого растения получено пять зерновок, из которых в С₄ из-за некоторых катаклизмов (произошёл срыв некоторых взошедших растений) выжило и дало потомство лишь одно растение с тремя продуктивными колосьями, которые уже больше походили на представителей мягкой пшеницы (рис.). Все полученные колосья были полностью фертильными. В колосках у них было не по две зерновки, что характерно для исходного *T. kiharae*, а во многих колосках, особенно в середине колоса, уже по три – четыре, что имеет место и характерно для мягкой пшеницы. Здесь вполне видны различия между исходным *T. kiharae* и полученным гомологом по строению колоса, колоскам и форме зерновок. Так, колос у гомолога более широкий. Ости у него расходятся, что присуще мягким пшеницам. Колоски намного шире, чем у *T. kiharae*, что связано с большим

количеством зерновок в них. Они по форме вполне похожи на зерновки мягкой пшеницы, тогда как у исходной формы они более вытянутые и не такие округлые. В то же время особых сомнений мягкой пшеницы пятого поколения в происхождении гомолога именно из *T. kiharae* нет, так как присутствует характерные для обоих признаки.



Рис. Колосья исходного *Triticum kiharae* (1) и полученного из него гомолога (2)

Ости у гомолога также имеют тёмный цвет, хотя заметно, что кончики светлее. Достаточно отчётливо выражено опушение колосьев у гомолога, что характерно и для *T. kiharae*. Хорошо просматривается и нервация на колосковых чешуйках, такая же, как и у *T. kiharae*. Что характерно, Куп полученного гомолога равнялось 0,87, что соответствует норме реакции для мягкой пшеницы, тогда как Куп исходного *T. kiharae* равнялось 0,49, что характерно спельтоидным формам, к коим относится последний. Таким образом, определённое фенотипическое сходство и аналогичный Куп предполагают, что полученная форма является гомологом *T. aestivum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пшеницы мира. Л.: ВО «Агропромиздат», Ленинградское отделение, 1987. 559 с
2. Романов Б.В., Пимонов К.И. Феномогеномика продукционных признаков видов пшеницы. п. Персиановский: Дон ГАУ, 2018. 188с.
3. Медников Б.М. Современное состояние вида и видообразования. В кн. Вавиловское наследие в современной биологии. М.: Наука, 1989. С. 136
4. Романов Б.В. Введение в феномогеномику количественных признаков рода *Triticum*.-п. Персиановский: Дон Гау, 2010. 136 с.

Работа выполнена на базе ЦКП Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг ЮФУ и лаборатории «Селекции и генетики с/х растений» ФГБНУ ФРАНЦ.

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НОВЫХ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ НА РАСТЕНИЯ РОДА *Cenchrus*

С.В. Сыксин^{1,2,3}, Ю.Ю. Кулакова⁴, В.Г. Кулаков⁴, А.Ю. Хохлов¹, Д.Ю. Муравьева¹,
А.А. Соловьев¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская

²Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42

³ООО «Синтол», 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42⁴ ВНИИКР
E-mail: Stason_16@inbox.ru

Ценхрус длинноколючковый (*Cenchrus longispinus*) – карантинный однолетний злаковый сорняк, который распространён во многих странах мира. Наиболее сильно засоряет посевы зерновых, кукурузы, подсолнечника, овощных, бахчевых культур и др. Необходимость изучения адвентивного элемента флоры вызвана малой изученностью и опасностью распространения на территории России. Целью исследования был набор видоспецифичных праймеров, позволяющий проводить идентификацию разных видов растений рода *Cenchrus*. Данные пары разработаны на основе STR-маркеров, разработанных на *C. americanus*. В работе исследовано восемь видов растений рода *Cenchrus* из различных регионов России, ближнего и дальнего зарубежья из коллекции Всероссийского центра карантина. Для выявления внутривидового генетического разнообразия использован набор из 40 STR-маркеров, из которых по 14 – установлен полиморфизм, позволяющий провести идентификацию изучаемых видов рода *Cenchrus*. Видоспецифические профили ампликонов данных STR-маркеров позволяют идентифицировать изучаемые виды. По ряду маркеров выделены видоспецифические бэнды карантинного объекта *C. longispinus*, позволяющие применять их в карантинном фитосанитарном контроле.

Работу проводили на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ и ООО «Синтол». Образцы предоставлены Всероссийским Центром Карантина Растений. Выделение ДНК образцов проводили с использованием разработанной методики (патент RU2672378C1). Биоинформатический анализ и обработку данных осуществляли через программное обеспечение UGENE (Россия) и AliView (Швеция). Синтез и расходные материалы для ПЦР, клонирования и секвенирования предоставлены компанией «Синтол». Для секвенирования интересующих фрагментов ДНК были сконструированы векторы с целевой нуклеотидной последовательностью. Лигирование происходило по «тупым» концам по сайту рестрикции SmaI вектора pUC57. С последующей трансформацией *E. coli* методом теплового шока. Секвенирование проводили на оборудовании НАНОФОР 05 (СИНТОЛ, Россия).

По результатам проведённой работы получены 22 родоспецифичных сиквенса, не совпадающих с известными нуклеотидными последовательностями в базе данных NCBI (NIH GOV, США). На данные последовательности было смоделировано 18 пар праймеров с присвоенными им флуоресцентными метками для проведения анализа с использованием капиллярного электрофореза. На обратные праймеры были добавлены последовательности, процессирующие однонуклеотидное полиаденилирование для избежания вариабельности в 0-1-2 нуклеотидов у получаемых ПЦР-продуктов. Для усиления сигнала при использовании меток TAMRA и ROX применяли метод переноса энергии по FAM – использовали комбинацию 5TAMRA-6t-(tFAM) и 5ROX-6t-(tFAM) для увеличения размера получаемого продукта на семь нуклеотидов. По результатам фрагментного анализа были отобраны девять пар праймеров, которые позволяли идентифицировать вид ценхруса из имеющейся коллекции, состоящей из 8 видов растений данного рода. Остальные девять пар были менее информативны, но имеют потенциальную возможность в идентификации.

СЕЛЕКЦИОННАЯ ЦЕННОСТЬ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕТРАПЛОИДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ РЕДИПЛОИДИЗАЦИИ

Э.Б. Хатеев, Г.В. Матвеева

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» 190000, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44.
E-mail: haed1967@rambler.ru

Прохождение генома кукурузы через полиплоидное состояние и обратно вынуждает клетки испытывать «геномный шок». При переводе диплоидного генома в тетраплоидный уже в первом поколении наблюдается повышенное число хиазм в мультивалентных ассоциациях хромосом. Для диплоидного генома такое состояние является нормой, и частота обмена ограничена двумя гомологичными хромосомами. В тетраплоидном геноме частота обмена происходит между четырьмя гомологичными хромосомами и возрастает до 6 раз. Частота изменчивости и широта полиморфизма фенотипических признаков у таких генотипов существенно отличаются от диплоидного.

Объектами исследований были среднепоздние тетраплоидные популяции (ФАО 460), созданные в Кабардино-Балкарском НИИСХ и Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко, на основе которых была разработана методика редиплоидизации тетраплоидного генома. Суть метода заключается в том, что среднепоздние тетраплоидные популяции скрещивали с раннеспелыми диплоидными линиями с целью получения триплоидных зерновок и смещения группы ФАО в сторону большей раннеспелости. На следующий год полученные триплоидные зерновки высевали в пластиковые стаканчики и проращивали до фазы 3–5 листьев. В фазе 3–5 листьев проростки переносили в грунт, где они вегетировали до цветения и созревания початков. Триплоидные растения кукурузы слабо фертильны и способны к инцухту. В период цветения триплоидные растения самоопылялись (инцухт). После уборки и сушки початков, завязавшиеся на них зерновки разделяли визуально по фракциям на предполагаемые $4n$, $2n$, $3n$, и анеуплоиды. Тестирование морфологическим методом полученных генотипов (σ^7) на стерильные диплоидные тестеры (σ^7) в следующем году позволило отделить истинные диплоидные линии от остальных. Выбровка проводилась по признаку завязывания полноценных диплоидных зерновок на початке диплоидного стерильного тестера. В случае, если опылитель оказывался диплоидом, то на початке тестера завязывались полноценные зерновки, а в случае, когда опылитель был тетраплоидным, то на тестерных початках завязывались триплоидные зерновки. Если растение было анеуплоидным, то на тестерном початке завязывались различные зерновки смешанной плоидности.

Исследования селекционной ценности редиплоидных линий проведенная в предгорной зоне Кабардино-Балкарии в ОПХ Нартан КБНИИСХ показали, что редиплоидные линии, восстановленные из тетраплоидных популяций, характеризуются широким полиморфизмом по всем признакам, имеющим селекционную ценность. На основе полученных редиплоидных линий созданы и испытаны в малом конкурсном испытании экспериментальные гибриды со стерильными раннеспелыми тестерами (Кр703М, Кр714М, Гк26М). Результаты анализа урожая зерна позволили выделить четыре гибридные комбинации, превысившие урожай зерна стандартных гибридов на 1,92 – 3,27 т/га при $НСР_{0,5} = 0,23$ т/га. Результаты исследований имеют значение для разработки теоретических основ селекции кукурузы, а также создания селекционно-ценных рекомбинантов и доноров эффективных генов количественных и качественных признаков кукурузы.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ «КРАСНОКНИЖНЫХ» ВИДОВ РОДА КАТРАН (*Crambe* L.) С ПРИМЕНЕНИЕМ ISSR- ПРАЙМЕРОВ

В.А. Чохели, А.Н. Шмараева, И.П. Кузьменко, Ж.Н. Шишлова, Т.В. Вардуни

*Ботанический сад ЮФУ, 344041, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пер. Ботанический спуск, 7
Email: vachokheli@srfedu.ru*

В работе представлены исследования пяти различных видов рода *Crambe* L.: *C. maritima* L. [*C. pontica* Stev. ex Rupr.] (катран морской), *C. pinnatifida* R. Br. [*C. maritima* subsp. *pinnatifida* (R. Br.) Schmalh.] (катран перистый), *C. tatarica* Sebeok (катран татарский), *C. cordifolia* Steven (катран сердцелистный), *C. steveniana* Rupr. (катран Стевана) [1], произрастающих на территории Ботанического сада ЮФУ в коллекции редких и исчезающих видов растений Ростовской области. Кроме того, для генетической паспортизации были выбран вид, наиболее близкий к семейству катрана – морская

горчица черноморская. И далёкий вид от семейства – клоповник широколистный. Систематику видов оценивали на основе классификации Конспекта флоры Кавказа [2].

Экстракция ДНК проводилась из листьев сорбентным методом при помощи коммерческого набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Россия). Концентрацию определяли на флюориметре Qubit 3.0 (Invitrogen, США). Общий объём ПЦР-смеси – 25 мкл. ПЦР-смесь (мастер-микс) готовили из расчёта на один образец: H₂O (DD) – 15,3 мкл, 25 мМ раствор нуклеотидов 10×dNTP – 2,5 мкл, 10×буфер для ПЦР – 2,5 мкл, 25 мМ хлорид магния (MgCl₂) – 2,5 мкл, мутантная Taq-полимераза – 0,2 мкл (5 ед./мкл), ДНК-матрица (концентрация 5 нг/мкл) – 1 мкл, праймер (10 пМ/мкл) – 1 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере T100 ThermalCycler (BIO-RAD, США). Протокол амплификации: 1. 94 °С – 5:00 минут, 2. 94 °С – 0:30 секунд, 3. Та °С – 0:45 секунд, 4. 72 °С – 2:00 минуты, 5. 34 цикла – пункты 2-4, 6. 72 °С – 5:00 минут. Использовали следующие ISSR-праймеры: UBC 811-(GA)₈C-Ta°С=53, UBC 835-(AG)₈YC-Ta°С=53,5, UBC 841-(GA)₈YC-Ta°С=52,5, UBC 857-(AC)₈YG-Ta°С=54, UBC 878-(GGAT)₄-Ta°С=48,5, UBC 880-(GGAG)₄-Ta°С=49,5. Разделение фрагментов проводили электрофорезом в 2 %-yiv агарозном геле с использованием 1xTBE-буфера (TRIS, Boric acid, EDTA) при мощности 100 В, 3 ча. Окрашивание фрагментов ДНК производили SYBR Green (x80). Детекцию фрагментов производили в гельдокументирующей системе GelDoc XR+ с программным обеспечением ImageLab версии 6.0 (производство Bio-Rad).

В нашем исследовании семи видов семейства BRASSICACEAE было детектировано 153 ISSR ДНК-маркера, из которых 145 были полиморфными. Среднее число маркеров, выявляемых одним праймером, составило 25,5, максимальное количество маркеров было равно 34 (праймер UBC 878), а минимальное — 20 (праймер UBC 841). На основе полученных данных генетического сходства видов рода *Crambe*, включая близкородственный вид из рода *Cakile* и дальнородственный вид из рода *Lepidium*, произрастающие на территории Ботанического сада ЮФУ, была построена дендрограмма генетического сходства (рис.).

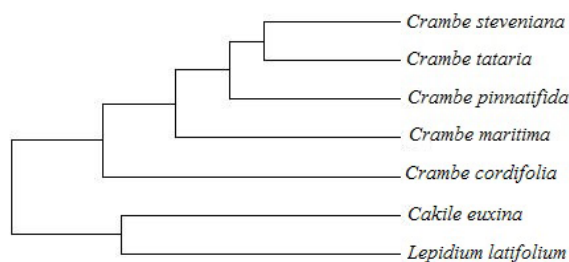


Рис. UPGMA-дендрограмма генетического сходства видов рода *Crambe*, построенная на основании полиморфизма ISSR-маркеров

В ходе изучения полученной дендрограммы видно, что в первом кластере два вида: *Crambe steveniana* и *Crambe tataria* из одной подсекции (*Tatariae*) образуют общую кладу. Остальные виды (*Crambe cordifolia*, *Crambe pinnatifida*, *Crambe maritima*) из другой подсекции (*Crambe*) выходят узлами от общей клады. Интересно отметить тот факт, что близкородственный и дальнородственный виды образуют общую кладу во втором кластере.

Похожие данные были получены при исследовании 27 видов рода катран на основе секвенирования спейсерных регионов (ITS1 и ITS2). В работе [3] показано, что *C. tataria*, *C. cordifolia*, *C. pinnatifida*, *C. maritima* входят в один общий кластер в секции *Crambe*. Однако три вида: *C. tataria*, *C. pinnatifida* и *C. maritima* входят в одну кладу, а *C. cordifolia* входит в другую кладу совместно с видами из секции *Orientecrambe*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузьменко И.П., Шмараева А.Н., Матецкая А.Ю. // Труды XIV съезда Русского ботанического общества и конференции «Ботаника в современном мире». Т. 2 Махачкала: АЛЕФ, 2018. С. 275–278.

2. Конспект флоры Кавказа: В 3 т. / Отв. ред. А.Л. Тахтаджян, Т. 3, ч. 2 / Под ред. Г.Л. Кудряшова, И.В. Татанов. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. 623 с.
 3. *Francisco-Ortega J., Fuertes-Aguilar J., Gomez-Campo C. et al. // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1999. Vol. 11, № 3, April. P. 361–380.*
-

ГЕНОФОНД РЕСУРСОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ НА ЮГЕ РОССИИ

В.В. Чумакова, В.Ф. Чумаков, Н.М. Романенко

*Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр, 356024, Российская Федерация, г. Михайловск, ул. Никонова, 49
E-mail: sosna777@bk.ru*

Одним из важнейших приоритетов развития медицины и фармацевтической промышленности Российской Федерации является создание новых отечественных лекарственных препаратов, в том числе на основе веществ природного происхождения. В связи с этим возникает потребность в расширении сырьевой базы за счёт поиска новых источников растительного сырья. Использование дикорастущих видов лекарственного растительного сырья в настоящее время и особенно в будущем ограничено в связи с проблемой сокращения биоразнообразия и резкого снижения запасов дикорастущей лекарственной флоры. Поэтому введение в культуру лекарственных растений, создание оригинальных сортов и гибридов, разработка высокоточных технологий их возделывания может рассматриваться и как способ их сохранения, и как возможность создания стабильной и гарантированной базы для получения фитопрепаратов. Интродукционные исследования актуальны для растений отечественной и инорайонной флоры, в том числе из-за рубежа.

Нашими исследованиями установлено, что в благоприятных почвенно-климатических условиях юга России, в том числе Ставропольского края, возможно выращивание и гарантированное получение высококачественного растительного сырья и семенного материала более 60 видов лекарственных растений. Работа с лекарственными травами, начатая в конце 90-х годов прошлого века на экспериментальном поле Ставропольского НИИ сельского хозяйства (ныне Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр), позволила установить интродукционную способность 130 видов лекарственных, пряно-ароматических, эфиромасличных и медоносных трав различного эколого-географического происхождения. Был изучен и собран генофонд более 2 000 образцов одно-, дву- и многолетних типов развития из 50 семейств. Наибольшее количество изученных образцов относилось к семействам губоцветные, сложноцветные, амарантовые и зонтичные. Выявлены виды, выращивание которых в условиях юга России невозможно или экономически невыгодно в силу хозяйственно-биологических особенностей растений. Установлено, что для введения их в культуру и создания высокоадаптированного исходного материала и новых сортов потребуется серьезная генетико-селекционная проработка. К таким видам были отнесены катарантус, будра, ятрышник, арника, адонис, кирказон.

В процессе интродукционных и селекционных работ были получены генетические источники и доноры продуктивности растительного сырья и семян, скороспелости, устойчивости к болезням, вредителям, полеганию, засухе, высокого содержания биологически активных веществ и других хозяйственно-полезных признаков и свойств в исходном селекционном материале Melissa лекарственной и турецкой, Issopa лекарственного, ромашки аптечной, душицы обыкновенной, лопуха анисового и морщинистого, эхинацеи пурпурной, шалфея мускатного, эфиопского и лекарственного, фенхеля обыкновенного и других видов.

На их основе было создано 18 новых сортов, из которых на сегодня в Государственном реестре селекционных достижений зарегистрировано 15 сортов с допуском их использования во всех регионах РФ. На основе местного дикорастущего материала создан сорт душицы обыкновенной Карамелька с

использованием интродуцированных образцов из различных экологических регионов России – мелисса лекарственная Ламбада, шалфей лекарственный Добрыня и мускатный Салют, фенхель обыкновенный Бачата, иссоп лекарственный Розовый фламинго, скорцонера Солнечная премьера, змееголовник молдавский Эгоист. Селекционная проработка образцов с североамериканского континента позволила создать адаптированные к условиям юга России новые сорта лوفанта анисового Премьер, амаранта Каракула и эхинацеи пурпурной Болеро.

Созданные сорта лекарственных и пряно-овощных культур способны решить проблему восстановления и развития отрасли лекарственного растениеводства в рамках реализации государственных программ импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны.

ГЕН ЛЕПТИНА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАРКЕР ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ ОВЕЦ

В.С. Шевцова¹, Л.В. Гетманцева², А.В. Усатов¹, М.А. Колосова³

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Всероссийский институт животноводства им. Л.К. Эрнста, 142132, Российская Федерация, г. Подольск, пос. Дубровицы, 60

³Донской государственный аграрный университет, 346493, Российская Федерация, пос. Персиановский, ул. Кривошлыкова, 24

E-mail: barbaragen4@mail.ru; ilonaluba@mail.ru; m.leonovaa@gmail

Важнейшими задачами интенсивного животноводства и овцеводства, в частности, являются разработка методов совершенствования существующих пород животных и сохранения имеющегося генофонда с одновременным повышением рентабельности отрасли за счёт улучшения продуктивных показателей животных и получения более высококачественного сырья. В этой связи особого внимания заслуживают гены – потенциальные маркеры, кодирующие ключевые гормоны метаболизма млекопитающих. Одним из генов, для которого достоверно установлено его влияние, как на основные метаболические пути, так и на продуктивные качества сельскохозяйственных животных, является ген лептина (LEP/ob gene).

Лептин секретируется клетками жировой ткани – адипоцитами, циркулирует по кровяному руслу и играет исключительно важную роль в регуляции метаболизма всего организма. Рядом исследователей установлено его участие в ангиогенезе, регулировании кровяного давления, дифференциации клеток, развитии мозга, кроветворении, формировании иммунной системы и регуляции репродуктивных функций [1]. Для человека известна строгая корреляция низкой концентрации лептина с ожирением; лептин рассматривается как один из факторов развития инсулиннезависимого сахарного диабета (сахарный диабет II типа). Для свиней показано влияние лептина как на мясные качества, так и на многоплодие и репродуктивное долголетие [2], для коров – на молочную продуктивность и состав молока. Исследованию полиморфизмов гена лептина у овец на сегодняшний день посвящено относительно небольшое количество работ и, в целом, его влияние на продуктивные качества овец изучено недостаточно.

Структура гена лептина, границы экзон-интрон и аминокислотная последовательность высококонсервативны для разных видов млекопитающих. У овец ген лептина локализован на 4 хромосоме, для кодирующей последовательности в dbSNP известно 22 SNP.

Целью первой работы по исследованию гена лептина у овец, проведенной в 2006 г. D. Boucher et al., был поиск полиморфизмов в кодирующей последовательности и исследование их ассоциаций с метаболическими процессами, ростом животных, мясными качествами и механическими свойствами мышечных волокон. В исследовании участвовали овцы пород Suffolk и Dorset. В ходе исследования

было обнаружено три полиморфизма, из них 2 SNP во втором интроне (A103G и C154T) и один в 3' UTR области (C617G). Мутации C154T и C617G оказались специфичными для породы Dorset, корреляции их с хозяйственно полезными признаками не установлено. Полиморфизм A103G был обнаружен у представителей обеих пород без значимых различий в частоте аллелей. Выявлено отрицательное влияние полиморфизма A103G на рост мышечной ткани у ягнят породы Suffolk [3]. При исследовании полиморфизмов, в работе [3] в популяции овец трёх аборигенных пород Ирана? было показана значительная корреляция A103G варианта гена *LEP* с характеристиками туши у пород Shal и Zel [4]. В работе [5] показано влияние полиморфизмов в интроне 2 и экзоне 3 на размер помёта и сезонность овец Awassi (Ирак). Влияние полиморфизма T483A на суточный привес пакистанских овец Lohi исследовалось в работе Ali Haider Saleem et al. [6].

Малое количество публикаций, посвящённых исследованию влияния лептина на продуктивные качества овец, а также значительные различия полиморфной структуры гена у представителей различных пород, позволяют рассматривать его в качестве перспективного маркера продуктивности для овец отечественных пород.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ali Haider Saleem et al.* // *Advances in Animal and Veterinary Science*. 2015. Vol. 3, Issue 5. P. 302–307.
2. *Getmantseva L. et al.* // *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2017. Vol. 23 (No 5). P. 843–850.
3. *Boucher D. et al.* // *Canadian Journal of Animal Science* March. 2006. Vol. 86. P. 31–35.
4. *Roohallah Barzehkar, Abdolreza Salehi, Frouzandeh Mahjoub* // *Iranian Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 7, № 4. P. 241–246.
5. *Laith Sofian Younis et al.* // *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 7, Issue 1. P. 17–23.
6. *Ali Haider Saleem et al.* // *Pakistan J. Zool.* 2018. Vol. 50 (3). P. 1029–1033. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.3.1029.1033>.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОНСКОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ

Д.П. Камфарин¹, И.В. Корниенко^{1,2}, М.С. Макаренко¹, Т.П. Шкурат¹

¹Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

²Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук, 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

E-mail: tshkurat@sfn.ru

Историческим местом выведения донской породы было правобережье реки Дон, как части Евразийской степи. На формирование старо-донской, задонской, а в последствие донской породы оказало влияние использование восточных лошадей (арабских и ахалтекинских) и английской верховой. Влияние английской крови достоверно зафиксировано зоотехнической документацией и не нуждается в дополнительном подтверждении. В нашу задачу входило доказательство влияния генофонда лошадей восточного происхождения на формирование донской породы я.

Целью данной работы было определить нуклеотидную последовательность фрагментов гипервариабельного района мтДНК арабской, алхитинской и донской пород лошадей.

В работе были изучены 13 выборки лошадей, из них четыре ахалтекинской породы, пять арабской и четыре донской породы лошадей. Для очистки продуктов ПЦР контрольного региона мтДНК их фракционировали в 1 %-ном агарозном геле (смесь 1:1 легко- и тугоплавкой агарозы) с использованием в качестве маркера молекулярных масс 1kb DNA Ladder Plus Gene Rulertm. Определение нуклеотидной последовательности в гипервариабельном участке D-петли митохондриальной ДНК проводили методом

автоматического секвенирования на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

При исследовании генома донской кобылы, в отличие от референсного генома лошади, определена новая мутация С15589А. В геноме мтДНК донской кобылы были определены полиморфизмы С15606Т, G15724А и С15775Т, отмечаемые также у арабских и ахалтекинских лошадей, участвовавших в данном исследовании. В образце донской кобылы на участке 15256 выявлен нуклеотид Т, причем в референсном геноме лошади и у других лошадей, участвующих в исследовании, он не определен (т.е. полиморфизм -16256Т). Общей для всех участников, и донской кобылы в том числе, является полиморфизм С16302Т. Построенная математическая модель филогенетического дерева позволяет учесть общие для разных животных мутации и соотнести их друг относительно друга и филогенеза пород, также иллюстрируя присутствие общих предков у представителей разных пород. Данная модель убедительно демонстрирует общность происхождения животных восточных пород (арабская, ахалтекинская) и донской.

Работа выполнена на базе ООО «АгроСоюз Юг Руси» Филиал «Племенной завод им. С.М. Буденного», конного клуба «Ход конем», конного клуба «Лидер» и лаборатории генетики человека и животных Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ, ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ.

Исследование выполнено в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ по теме: "Исследования функциональной роли генетических полиморфизмов и микро РНК в геноме человека и животных", проект № 6.6762.2017 БЧ.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ	3
<i>Arsen Arakelyan, Lilit Nersisyan, Maria Nikoghosyan, Siras Hakobyan, Henry Loffler-Wirth, Hans Binder.</i> Transcriptome-Based Biologics Repositioning Using Machine Learning Approaches	3
<i>Ancha Baranova.</i> Health Trajectories of Heterozygous Carriers as a Novel Resource for the Study of Human Body Homeostasis	3
<i>М.М. Асланян.</i> От сигальных генов до геномной селекции.....	4
<i>П.И. Белобров.</i> Родословная книги клетки.....	5
<i>А.И. Ким.</i> Как стать мужчиной	8
<i>П.И. Костылев.</i> Маркерная селекция риса в Ростовской области.....	8
<i>К.А. Лепихов.</i> Динамика профиля модификаций цитозина в раннем эмбриогенезе мыши	10
<i>А.А. Нижников.</i> Структурные основы механизмов запасания белка у растений	10
<i>Е.В. Празднова.</i> Антимутагенные свойства пробиотиков	11
<i>А.В. Усатов, М.С. Макаренко, К.В. Азарин, Н.В. Маркин, Н.С. Колоколова.</i> Генетические исследования подсолнечника в Южном федеральном университете	13
<i>Н.К. Янковский.</i> Биологические ресурсы как истоки и пределы существования человеческого общества	15
КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА. ПЕРСОНАЛИЗОВАННАЯ МЕДИЦИНА	17
<i>Ю.Э. Азарова, Е.Ю. Клёсова, В.А. Азарова, А.И. Конопля, А.В. Полоников.</i> Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена субъединицы р22rhoх НАДФН-ОКСИДАЗЫ (СУВА) с риском развития сахарного диабета 2-го типа у жителей Центральной России.....	17
<i>А.Ю. Акпарова, А.А. Арипова, М. Садвокасова, М.Т. Абишев, Р.И. Берсимбай.</i> Анализ ассоциации полиморфных вариантов <i>Arg16Gly</i> и <i>Gln27Glu</i> гена <i>ADRB2</i> с бронхиальной астмой в казахской популяции	18
<i>К.А. Алиев, К.Д. Малый, Н.К. Малая, В.В. Олексенко, Г.Н. Телькиева.</i> Мутации генов <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> у больных раком молочной железы в популяционных группах жителей Крымского полуострова	20
<i>И.А. Аллилуев, Е.В. Заикина, Е.М. Вечканов.</i> Оценка повреждений ДНК у пациентов с физиологической и осложнённой гестационным сахарным диабетом беременностью.....	20
<i>Н.М. Алнассар, М.М. Згаби.</i> Роль полиморфизма <i>Pro72Arg</i> гена <i>TP53</i> в развитии ишемической болезни сердца.....	22
<i>Т.Н. Астахова, С.С. Таможников, А.А. Выскребцов, А.А. Карпова, Н.В. Борисова, Д.В. Базовкина, А.Н. Савостьянов.</i> Влияние полиморфизма 5-НТТЛР на нейрофизиологические процессы в парадигме стоп-сигнал у людей, живущих в различных социо-климатических условиях Сибири	22
<i>Ю.С. Белицкая, Е.В. Машкина.</i> Исследование ассоциации полиморфизма <i>Gln192Arg</i> гена <i>PON1</i> с нарушением сперматогенеза.....	24
<i>А.А. Белоногов.</i> Исследование взаимосвязи поведенческих реакций на стимулы в парадигме «odd-ball» и при распознавании эмоциональной письменной речи с генетическим полиморфизмом 5-НТТЛР у здоровых детей и детей с СДВГ.....	25
<i>Ю.А. Веряскина, С.Е. Титов, В.В. Кометова, В.В. Родионов.</i> Исследование внутриопухолевой молекулярно-генетической гетерогенности люминального рака молочной железы.....	27

В.В. Внуков, И.В. Кролевец, С.Б. Панина, А.А. Ананян, А.А. Плотников, М.А. Забродин, Н.П. Милютина. Поиск SNP-МАРКЕРОВ предрасположенности к посттравматическому гонартрозу среди генов, регулирующих развитие окислительного стресса и воспаления.....	28
Г.И. Волосовцова, Е.В. Бутенко. Полиморфизм генов микро-РНК-33А, -758, -96 при различной степени тяжести атеросклероза	30
А.А. Выскребцов. Влияние генетического полиморфизма 5-HTTLPR на индивидуальные особенности поведенческих и ЭЭГ реакций в условиях распознавания эмоциональной письменной речи у трудовых мигрантов в условиях адаптации к субарктическому климату.....	31
О.М. Глумова, Е.В. Машкина. Исследование полиморфизма гена <i>ATP8A1</i> у мужчин с патоспермией	33
Л.А. Джапаридзе. Генетика долголетия	34
А.С. Ефремова, Н.В. Булатенко, Т.Б. Бухарова, Н.В. Петрова, Н.Ю. Каширская, А.Ю. Воронкова, Ю.Л. Мельяновская, Е.И. Кондратьева, Р.А. Зинченко, Д.В. Гольдштейн. Персонализированная оценка влияния таргетных препаратов на функциональную активность канала CFTR у больных муковисцидозом в России	35
И.Ж. Жалсанова, Е.Ю. Брагина, М.Б. Фрейдин, Н.П. Бабушкина, В.П. Пузырев. Общность ассоциаций <i>TNFB</i> (rs2239704) и <i>TNFRSF1B</i> (rs652625) с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза лёгких.....	36
А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова. Анализ гена интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (<i>IFITM5</i>) у больных незавершённым остеогенезом	37
В.В. Куценко. Ассоциация полиморфных вариантов гена Интерлейкина-10 с риском развития шизофрении.....	39
Н.А. Лемская, С.А. Романенко, А.А. Дольский, Д.Ю. Прокопов, А.Р. Шорина, Ю.В. Максимова. Методы молекулярной цитогенетики в описании кариотипической патологии	40
С.В. Ломтева, К.Ю. Сагамонова, Т.П. Шкурат, К.Г. Савикина, О.В. Лянгасова, М.В. Левченко, А.Н. Шестель, М.А. Максимова, Г.А. Чурюмова, А.С. Зейнулабидова. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера <i>Ser326Cys</i> гена <i>hOGG1</i> при патоспермии	41
А.В. Мезенцев, Ю.А. Мозулевцева, С.А. Брускин. Использование методов молекулярной диагностики в иммунотерапии псориаза.....	42
И.Ю. Митрошина, Н.П. Сирота, В.Н. Прокофьев, Е.А. Кузнецова. Определение циркулирующих ДНК в сыворотке крови здоровых доноров разного пола и возраста для диагностики патологического состояния.....	43
А.А. Никанорова, Л.А. Кларов, М.М. Попов, Н.А. Барашков. Молекулярно-генетический анализ гена <i>SLC26A4</i> у пациентов с аномалиями внутреннего уха (EVA и MONDINI) в Якутии.....	44
А.В. Ноздрачева, Н.М. Плещач, И.М. Спивак, М.Л. Куранова. Клеточные методы в диагностике наследственных заболеваний	46
Е.П. Омельчук, Д.Ю. Гвалдин, Н.Н. Тимошкина, С.Н. Кабанов, А.Е. Сторожаква. Генотипирование пациентов с диагнозом рак молочной железы с целью прогноза развития антрациклин-опосредованной кардиотоксичности вследствие химиотерапии.....	47
Д.Д. Пивоварова. Полиморфизмы гена <i>MBL2</i> и риск развития гепатита В у жителей Ростовской области.....	48
Т.А. Самгина, Г.Н. Мяснянкина, П.М. Назаренко, А.В. Полоников. Роль полиморфизма гена фосфатидилэтаноламин-N-метилтрансферазы в развитии острого панкреатита и его осложнений	49
М.В. Согоян, С.Е. Хальчицкий, С.В. Виссарионов, А.Г. Баиндурашвили, А.В. Дмитриев. Исследование молекулярно-генетических факторов этиологии и прогрессирования врожденных деформаций позвоночника у детей.....	50

А.Д. Татарченко, С.С. Амелина, Е.В. Машкина, О.М. Нескубина, Е.П. Гальбас. Программа комплексной персонифицированной диагностики каротидного атеросклероза.....	51
О.В. Бочарова, Е.Д. Теплякова, А.В. Мекеня. Анализ межгенных взаимодействий генов липидного обмена и гена <i>FTO</i> при экзогенно-конституциональном ожирении у подростков.....	53
И.Г. Удина, В.С. Учаева, В.В. Волобуев, А.С. Грачева, Ю.А. Васильев. Изучение молекулярно-генетических ассоциаций раннего кариеса зубов у детей в Краснодарском крае	54
П.А. Усольцева, Т.О. Холодная, А.А. Александрова. Исследование аллельных вариантов некоторых генов иммунной системы у женщин с персистирующей папилломавирусной инфекцией	56
В.С. Фишман, Э.С. Валеев, П.С. Белокопытова, О.В. Фенькова, С.В. Михайлова, А.Ж. Фурсова, М.И. Воевода, Д.Е. Иванощук. Скрининг редких замен в генах, вовлечённых в дисгенез угла передней камеры глаза у пациентов с врождённой глаукомой.	57
Абд Али Алаа Хашиим, Т.П. Шкурят. Изучение полиморфизма rs9939609 гена <i>FTO</i> у арабов и русских при ожирении.....	59
Т.А. Шерчкова, С.В. Ломтева, К.Ю. Сагамонова, О.В. Лянгасова, А.А. Александрова, Т.П. Шкурят. Ассоциации полиморфизмов гена <i>XRCC1 Arg280His</i> и <i>Arg399Gln</i> с различными типами патоспермии	59
В.Д. Щербинина. Изменения в геноме клеток при стрессе и психических расстройствах	61
В.В. Эрдаман, Т.Р. Насибуллин, И.А. Туктарова, Я.Р. Тимашева, Т.В. Викторова, О.Е. Мустафина. Анализ ассоциаций фармакогенетического маркера rs1208 гена <i>NAT2</i> с возрастом в трёх этнических группах жителей Республики Башкортостан.....	61

ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЕНОМА. БИОИНФОРМАТИКА 63

К.В. Азарин, М.С. Макаренко, А.А. Ковалевич, А.В. Усатов. Структурно-функциональная организация хлоропластных геномов у внеядерных хлоропластных мутантов подсолнечника.....	63
А.В. Архипов, В.К. Вишниченко. Изменения транскрипционных программ экспрессии факторов врождённой иммунной системы растения-хозяина в условиях персистентной вирусной инфекции.....	64
Д.В. Богуславский. Палеогеномика и доместикация.....	66
О.Ю. Бордаева. Изучение участков генома в окрестности генов, ассоциированных с развитием преэклампсии.....	67
В.А. Грабарь. Пространственная организация функциональных элементов на Y-хромосоме человека.....	68
Т.М. Гришаева, С.Н. Матвеевский. Сравнение консервативности CDK2 и BRCA1: теория и практика.....	69
Э.Б. Дашинимаяев, К.К. Сухинич, В.Е. Дьяконова, Д.В. Богуславский, И.С. Захаров. Транскриптомный анализ экспрессии генов нейротрансмиттерных систем в культурах нейронов человека, полученных из ИПСК.....	70
Т.Г. Зачепило, Н.Г. Лопатина. Метилирование гистона H3K4 в механизмах памяти медоносной пчелы.....	72
С.Н. Матвеевский, С.Д. Столяров, О.Л. Коломиец. Иммуноцитологический анализ хромосом в профазе I мейоза у гладкой шпорцевой лягушки <i>Xenopus laevis</i>	72
Д.Е. Романов, Г.Б. Бахтадзе. Геномные корреляты размера тела и продолжительности жизни млекопитающих.....	74

Т.Е. Саматадзе, Ф.М. Хазиева, О.Ю. Юркевич, А.И. Морозов, А.В. Амосова, О.В. Муравенко. Внутривидовой полиморфизм <i>Chelidonium majus</i> L.....	74
С.А. Симановский, С.Н. Матвеевский, Е.И. Рачек, Д.Ю. Амеросов, В.А. Трифонов, Н.С. Мюге, Е.Д. Васильева, В.П. Васильев. Анализ мейотических хромосом у некоторых видов и гибридов осетровых рыб в контексте полиплоидной эволюции.....	76
В.Н. Смирский, Ю.В. Маркитантова. Биоинформационный анализ гомеобоксодержащих генов семейства Pitx хвостатых амфибий: структурная организация и синтения локусов.....	77
В.А. Хачумов, К.В. Азарин, А.А. Ковалевич, К.Ф. Кан, М.С. Макаренко, А.В. Усатов. Сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов у видов рода <i>Helianthus</i> L.	79
Ф.С. Шарко, Е.Б. Прохорчук. Усовершенствование системы комплексной оценки племенной ценности по совокупности признаков молочной продуктивности путём итерационного вычисления ковариационной матрицы остаточной ошибки.....	80
Е.Б. Шарыпова, И.А. Драчкова, И.В. Чадаева, М.П. Пономаренко, Л.К. Савинкова. Прогнозы и экспериментальное определение <i>in vitro</i> влияния неаннотированных SNPs промоторов эритроидных генов на аффинность TBP/TATA и когнитивные нарушения ...	81
М.В. Шинкевич, А.В. Кондратюк, С.В. Вакула, М.Н. Шаптуренко, А.В. Кильчевский. Связь полиморфизмов в генах <i>HERC2</i> (rs12913832) и <i>OCA2</i> (rs1800407) с вариацией цвета глаз в белорусской популяции.....	83
М.А. Шкурат, М.А. Амелина, Н.А. Григорян, Н.С. Пономарева. Анализ <i>in silico</i> сайтов связывания miRNAs вокруг генов липидного обмена и ферментов антиоксидантной защиты.....	84
КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ. BIOTEХНОЛОГИЯ	86
V. Rajput, V. Chaplygin, V. Lysenko, I. Sazonov, A. Barbashev, S. Sushkova, S. Mandzhieva. Fluorescence Analysis of Chlorophyll in Barley Grown in Polluted Soil.....	86
А.С. Азаров, А.В. Усатов, Н.Г. Дуплий. Метаморфоз дедифференцированной ткани <i>in vitro</i> в фенотипический аналог донора экспланта.....	87
О.Ю. Арамова, Т.Г. Фалеева, М.А. Махоткин, А.И. Андриянов, И.В. Корниенко. Инновационная методика деконтаминации археологического биологического материала.....	89
С.И. Вакула, М.В. Шинкевич, М.Н. Шаптуренко, А.В. Кондратюк, А.В. Кильчевский. Полиморфизм гена <i>MC1R</i> в практике идентификации личности неизвестного индивида по его ДНК.....	90
А.В. Гильдебрант, Д.Н. Кушнарёва, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина. Влияние полициклических ароматических углеводов на интенсивность образования бактериальных биоплёнок.....	91
А.А. Криницына, А.С. Сперанская, Т.В. Сизова, Е.Э. Северова, А.В. Федотова, Д.О. Омельченко, А.А. Касьянов, А.С. Айгинин, М.Д. Логачева. Определение ботанического происхождения мёда методом метабаркодирования	92
В.Г. Лебедев, Н.М. Субботина, Е.О. Видягина, К.А. Шестибратов. Анализ сортов малины по генам биосинтеза флавоноидов с использованием SSR маркеров.....	93
Д.В. Науменко. Аддитивные методы быстрого прототипирования микрофлюидных устройств.....	94
И.А. Сизова, В.И. Шалгуев, Н.Г. Соболева, Р. Негетанн, В.Н. Вербенко. Редактирование генов с использованием рибонуклеопротеинного комплекса CRISPR SpCas9/gRNA у микроводоросли <i>Chlamydomonas</i>	95
С.О. Синицын, А.Е. Самойлов, А.А. Криницына, Е.В. Корнеенко, А.А. Касьянов, М.Д. Логачёва, А.С. Сперанская. Идентификация состава монокомпонентных пряностей, заявленных как “КРАСНЫЙ ПЕРЕЦ”, “ПАПРИКА” (<i>Capsicum sp.</i>) с помощью NGS.....	96

<u>А.О. Ситковская, Е.Ю. Златник, И.В. Межевова, Е.С. Бондаренко, С.А. Колпаков, Е.П. Колпакова, И.А. Новикова.</u> Один из подходов для генерации опухолеспецифических Т-лимфоцитов <i>in vitro</i>	98
<u>К.М. Степанов, С.И. Семенов.</u> Создание специализированных продуктов при заболеваниях печени на основе использования арктического сырья	99
<u>О.М. Цивилева, А.И. Перфильева, А.Г. Павлова.</u> Действие элемент-содержащих препаратов из высших грибов на бактериальные патогены растений.....	100
<u>В.К. Чмыхало, Т.П. Шкурат, А.А. Александрова.</u> Влияние экспрессии изоформ TET3 на характер образования модификаций ДНК в культуре клеток НЕК293Т.....	101
<u>Т.В. Шамова, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, И.В., Межевова, С.Ю. Филиппова, О.В. Нистратова, Н.С. Карнаухов, Н.С. Кузнецова.</u> 5-АЛК для создания первичных опухолевых клеточных линий глиальной этиологии.....	102
<u>Л.А. Эльконин, В.М. Панин, О.А. Кенжегулов, Г.А. Геращенко.</u> Методы современной генетики для улучшения питательной ценности зернового сорго	104
ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ. МИКРОБИОМ. ГЕНОТОКСИКОЛОГИЯ	106
<u>Е. Абакумов, Е. Иванова, А. Кимеклис, Г. Гладков, А. Зверев, Е. Першина, Е. Андронов.</u> Метагеномные исследования почв на начальных стадиях педогенеза	106
<u>Т.Н. Ажогина, А.А. Аль-Раммахи, Н.В. Гненная, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина.</u> Оценка токсичности почв Ростовской области с помощью биOLUMИнесцентных тестов	107
<u>С.В. Баженов, О.Е. Мелькина, С.А. Хрульнова, А.В. Кириченко, И.В. Манухов, Г.Б. Завильгельский.</u> Каскадный механизм регуляции QUORUM SENSING системы I типа психрофильных бактерий <i>Aliivibrio logei</i>	108
<u>Е.Д. Баранова, В.П. Волобаев, В.Г. Дружинин.</u> Особенности таксономического состава бактериальной микрофлоры респираторного тракта больных антракосиликозом.....	109
<u>С.А. Бережной, О.Д. Антонова, Н.И. Будина.</u> Распространённость и спектр мутаций <i>M. tuberculosis</i> , определяющих лекарственную устойчивость к фторхинолонам на территории Ростовской области.....	110
<u>Н.В. Гненная, Л.Е. Хмелецова, А.А. Аль-Раммахи, Т.Н. Ажогина, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина.</u> Загрязнение водоёмов Ростовской области генами лекарственной устойчивости	111
<u>Е.Ю. Гнучих, И.В. Манухов, Г.Б. Завильгельский.</u> Роль АТФ-зависимых шаперонов в рефолдинге и термостабильности белков в бактериях <i>Escherichia coli</i> и <i>Bacillus subtilis</i>	112
<u>А.В. Горовцов, Т.М. Минкина, В.В. Зинченко, В.А. Чаплыгин.</u> Влияние совместного внесения углеродистых сорбентов и штаммов микроорганизмов на состояние растений ячменя <i>Hordeum vulgare</i> L.....	113
<u>А.В. Горовцов, Т.М. Минкина, С.Н. Сушкова, В.А. Чохели.</u> Выделение и молекулярно-генетическая идентификация штаммов металлоустойчивых бактерий из почв оз. Атаманское	115
<u>Е.П. Гулевич, Л.В. Кузнецова, Ю.В. Киль, В.Н. Вербенко.</u> Роль ДНК-геликазы, кодируемой геном <i>UvrD Deinococcus Radiodurans</i> R1, в феноме радиорезистентности ...	116
<u>В.Ю. Дробот, В.А. Выростков, Е.В. Яровая, А.В. Гильдебрант.</u> Изучение влияния детергентов на образование бактериальных биоплёнок.....	118
<u>О.В. Егорова, Н.А. Илюшина.</u> Исследование мутагенности пестицидов-аналогов в модифицированном формате теста Эймса.....	119
<u>С.А. Емельянец, Е.В. Празднова.</u> Использование генномодифицированных бактерий для оценки биологических свойств углеродных наночастиц	120
<u>Ф.Д. Иванов, А.В. Горовцов.</u> Сезонная динамика численности микроорганизмов в естественных и антропогенно-преобразованных почвах г. Ростова-на-Дону	121

Н.А. Илюшина, О.В. Егорова, Ю.А. Ревазова, Н.С. Аверьянова, Е.А. Прокофьев, М.А. Макарова, О.О. Дмитричева, Л.А. Кара, Г.В. Масальцев, Ю.В. Сифонова. Оценка генетической безопасности пестицидов, производных сульфонилмочевины	123
А.В. Каплина, Т.Н. Ажогина, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина. Влияние поллютантов на возникновение резистентности к рифампицину у бактерий.....	124
Ш.К. Карчава, М.В. Климова, Е.М. Кудеевская, Т.Н. Ажогина, А.В. Гильдебрант. Влияние углеводов и антибиотиков на генотоксичность почв модельных микрокосмов	125
А.Г. Кессених, Э. Вагапова, А.В. Баранова, М.В. Бермешев, В.Г. Певгов, В.О. Самойлов, С.В. Шорунов, Л.С. Ягужинский, А.Л. Максимов, И.В. Манухов. Токсическое воздействие 2,2'-БИС(БИЦИКЛО[2.2.1]ГЕПТАНА) на живые клетки	126
М.В. Климова, Ш.К. Карчава, Е.М. Кудеевская, Т.Н. Ажогина, А.В. Гильдебрант. Анализ токсичности почв полигонов твёрдых бытовых отходов Ростовской области.....	128
С.В. Козьменко, А.В. Горовцов. Динамика численности аэробных спорообразующих бактерий в антропогенно-преобразованных почвах г. Ростова-на-Дону	129
А.В. Коржук, А.С. Розанов, С.Е. Пельтек. Микробное сообщество озера Фауста, о. Кунашир, Россия.....	130
А.А. Кудрявцева, И.В. Манухов, Г.Б. Завильгельский. Сайт-направленный мутагенез гена <i>ARDB</i> из конъюгативной плазмиды R64. Антирестрикционная активность мутантов.....	131
Т.В. Кузина, А.В. Кузин. Анализ взаимосвязи цитогенетических нарушений в периферической крови и маркера оксидативного стресса (МДА) у бычковых рыб Северного Каспия	133
И.О. Покудина, М.А. Федорова, А.М.А. Аль-Джавади. Генетические маркеры резистентности к бета-лактамам у внебольничных штаммов <i>Klebsiella spp.</i>	134
А.В. Полякова, Е.Е. Никитова. Особенности микробиома дыхательных путей недоношенных новорожденных.....	135
И.С. Сазыкин, Л.Е. Хмелевцова, Т.Н. Ажогина, М.А. Сазыкина. Окислительный стресс у прокариот – жёсткий механизм адаптации к новым органическим субстратам	136
М.А. Сазыкина, М.В. Климова, Ш.К. Карчава, М.И. Хаммами, А.А. Аль-Раммахи, И.С. Сазыкин. Токсичность куриного помёта и полученных из него пироуглей.....	138
А.С. Саксаганская, М.Е. Черкасова, В.С. Мунтян, М.Л. Румянцева. Молекулярно-генетические подходы анализа высокоэффективных штаммов <i>Sinorhizobium meliloti</i>	140
В.Н. Стаценко, М.П. Куликов, Е.В. Празднова, Е.Ю. Харченко, Н.В. Коростылев, Т.В. Белик. Антиоксидантная, ДНК-протекторная и SOS-ингибирующая активность метаболитов <i>Enterococcus durans</i>	141
В.В. Степаненко, И.Н. Сазонов, Н.П. Черникова, Е.Д. Кулаева, Е.В. Бутенко, С.С. Манджиева. Цитогенетические изменения корневой меристемы <i>Hordeum sativum</i> при загрязнении медью.....	143
Л.Е. Хмелевцова, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина. Влияние окислительного стресса на трансформацию углеводородных субстратов нефтеокисляющими бактериями.....	144
М.Е. Черкасова, А.С. Саксаганская, В.С. Мунтян, М.Л. Румянцева. <i>hsd</i> -гены как маркеры-поиска хозяйственно-ценных штаммов <i>Sinorhizobium meliloti</i>	146
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА	148
Т.Н. Tamrazov. Determining the Effects of Drought on Major Physiological Parameters in Plants	148
М.А. Акименко, Т.С. Колмакова, О.В. Воронова. Молекулярные маркеры эпителиально-мезенхимального перехода при адаптации нефрона к длительной обструкции мочеточника.....	149

Альхаддур Азиз. Влияние фитохимических веществ на интенсивность свободно-радикальных реакций в клетках человека	151
О.Н. Антосюк, Е.В. Болотник, В.Н. Орлова, А.С. Постовалова. Оценка протекторных свойств экстрактов <i>Prunella grandiflora</i> L. и <i>Achillea millefolium</i> L. на примере <i>Drosophila melanogaster</i>	151
М.Ю. Вакуленко, Е.В. Бутенко, Н.И. Акинина, В.Н. Демидов, В.Ф. Пономарева, В.Ф. Пономарева. Исследование уровня экспрессии гена <i>ADA</i> в опухолях молочной железы кошек.....	152
Н.Г. Васильченко, А.В. Горовцов, М.С. Мазанко, Л.Е. Кухаренко, В.А. Чистяков. Влияние культуры-предшественника и сорта озимой пшеницы на активность бактерий-антагонистов фитопатогенных грибов <i>P. fusarium</i>	155
В.В. Внуков, О.И. Гуценко, С.Б. Панина, И.В. Корниенко, А.А. Ананян, А.А. Плотников, Н.П. Милютин. Регуляция апоптоза митохондриально-направленным антиоксидантом в головном мозге и лимфоцитах крови при окислительном стрессе.....	157
В.Н. Гудко, А.В. Усатов, Ю.В. Денисенко. Влияние гидротермических факторов на урожайность кукурузы в различных агроклиматических зонах Ростовской области	158
С.В. Демьяненко, В.А. Дзрян, В.В. Никул, А.Б. Узденский. Селективные ингибиторы гистоновых деацетилаз – новый класс препаратов для терапии инсульта	160
В.А. Дзрян, В.В. Гузенко, С.В. Родькин, В.В. Никул, М.А. Путинова, М.Ю. Бибов. Экспрессия сигнальных белков в ганглиях дорсальных корешков крысы после перерезки седалищного нерва.....	161
Н.Г. Дуплий, А.В. Усатов, А.С. Азаров, А.А. Дворник. Сравнительный анализ действия митохондриальных антиоксидантов (SkQ1 и SkQ3) на скорость роста зерновых культур в различных условиях увлажнённости.....	162
Г.В. Карантыш, М.П. Фоменко, А.М. Менджеричкий, Е.В. Бутенко. Экспрессия генов субъединиц НМДА-рецепторов в гиппокампе у крыс в модели экспериментального диабета.....	163
Е.Ю. Кириченко, А.К. Логвинов. Межнейрональные и межглиальные щелевые контакты в норме и при развитии глиальных опухолей головного мозга	165
М.Ю. Копаева, А.М. Азиева, А.В. Смирнова, А.Б. Черепов, М.В. Нестеренко, И.Ю. Зарайская. Клеточная локализация лактоферрина человека в культуре клеток головного мозга мышей в условиях стимуляции.....	166
О.Л. Кундупьян, Е.К. Айдаркин, Ю.Л. Кундупьян, А.Н. Старостин, М.Ю. Бибов. Влияние одорантов разной направленности на спектральные характеристики ЭЭГ при выполнении вербальных и невербальных задач.....	167
Е.С. Левенкова, С.Н. Каиштанов. Фенотипическая и генотипическая изменчивость русского соболя <i>Martes zibellina</i> L.	168
Н.А. Ломтева, Е.И. Кондратенко, С.К. Касимова, Н.В. Нетипанова. Морфологические и эколого-биологические особенности ценопопуляций лотоса орехоносного в Астраханской области	169
А.В. Лысенко. «Дорожная карта» продления жизни: значение регуляторов экспрессии генов.....	171
Т.А. Мараховская, Н.Э. Скобликов. Моделирование геохимических условий происхождения генетических систем.....	172
Т.В. Миллер, Г.В. Карантыш, А.Н. Вовк. Изучение миграции клеток костного мозга в лёгкие с использованием генетических маркеров	173
В.А. Напримеров, К.А. Окотруб, Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, С.В. Раннева, Э.А. Чуйко, И.Н. Рожкова, В.И. Мокроусова, С.Я. Амстиславский. Модификация состава липидных гранул в преимплантационных эмбрионах млекопитающих при их культивировании <i>in vitro</i>	174

<i>А.Е. Панич, А.А. Панич, С.Н. Свирская, А.Ю. Малыхин, А.В. Скрылёв, Е.С. Алексюнин, Е.А. Панич.</i> Инновационные технологии для биомедицинского применения	175
<i>И.Г. Панова, М.Д. Чибирева, Ю.В. Сухова, А.С. Татиколов, Р.А. Полтавцева, Т.Ю. Иванец.</i> Молекулы-антиоксиданты в стекловидном теле глаза плодов человека: мочева кислота и катехоламины	179
<i>А.Ю. Паритов, З.И. Боготова, М.М. Биттуева, Т.Х. Хандохов.</i> Молекулярно-генетические основы сахарного диабета I типа	181
<i>В.М. Пахомова, А.И. Даминова, И.А. Гайсин.</i> Антимутагенное действие продукции растениеводства и его регуляция микроэлементами	182
<i>Н.А. Петров, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова.</i> Влияние органической формы ванадия на степень тревожности, пространственное обучение и память крыс-самцов линии Вистар с индуцированными нарушениями углеводного обмена	183
<i>М.Б. Саидов, Э.З. Эмирбеков.</i> Резистентность эритроцитов к окислительному стрессу у крыс при умеренной гипотермии разной продолжительности.....	184
<i>Н.М. Седых.</i> Расчётный прогноз экотоксичности ионной жидкости на основе гипофосфита имидазолия.....	186
<i>В.А. Синюкова, А.В. Чиринскайте, М.Е. Велижанина, Т.А. Белашова, Ю.В. Сопова, С.П. Задорский, А.П. Галкин.</i> Анализ амилоидных свойств белка STXBP1 в бактериальной системе C-DAG.....	186
<i>К.Ю. Сагамонова, С.В. Ломтева, Т.П. Шкурат, Е.С. Бугримова, О.С. Золотых, А.А. Клепикова, Т.А. Казанцева, А.Н. Шестель, И.Б. Крутящая, И.Б. Кучеренко.</i> Анализ программ ВРТ у пациенток с хроническими формами гепатитов В и/или С.....	188
<i>Л.Е. Сорокина, И.И. Фомочкина, В.И. Петренко, А.С. Кучеренко, С.С. Халилов.</i> Разработка оптических методов исследования функционирования мозга.....	189
<i>Н.А. Ткачев, В.А. Серезенков.</i> Регистрация марганцевой супероксиддисмутазы в плодах можжевельника методом ЭПР-спектроскопии	190
<i>А.С. Фомина, К.Ю. Гануша.</i> Исследование нейрофизиологических механизмов, лежащих в основе успешного и не успешного решения математических примеров с дробями.....	191
<i>А.С. Фомина, О.В. Куклис.</i> Исследование специфики решения когнитивных задач студентами музыкальных и биологических специальностей.....	192
<i>Р.А. Халилов, А.М. Джафарова, Э.З. Эмирбеков.</i> Активность и кинетические свойства лактатдегидрогеназы мозга сусликов при зимней спячке.....	194
<i>Н.П. Черникова, А.Г. Федоренко, С.С. Манджиева, М.В. Бурачевская, В.А. Чаплыгин, Т.М. Минкина, Т.М. Хассан.</i> Анатомо-морфологические изменения тростника обыкновенного импактной зоны.....	195
ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ. СЕЛЕКЦИЯ	197
<i>Р.А. Агаев, Л.А. Беспалова, Е.В. Агаева, О.Ю. Пузырная.</i> Продолжительность периода «всходы – колошение» и тип цветения пшеницы мягкой озимой	197
<i>А.А. Адамбаева, И.Я. Нам, В.В. Заякин.</i> Исследование аллельного полиморфизма крупного рогатого скота Казахстана в связи с устойчивостью к бруцеллёзу.....	198
<i>С.Ю. Бакоев, Л.В. Гетманцева, Н.А. Зиновьева.</i> Исследование паттернов гомозиготности у свиней закрытых коммерческих популяций.....	199
<i>Н.Ф. Бакоев, Л.В. Гетманцева.</i> Особенности нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК у овец мериносовых пород отечественной и зарубежной селекции.....	201
<i>А.С. Богданов.</i> Генетическая изменчивость и дифференциация популяций обыкновенной слепушонки <i>Ellobius talpinus</i> на территории Поволжья, Уральского региона, Западной Сибири и Средней Азии	202

Г.В. Бокий, Е.В. Картамышева, В.Е. Кондаурова. Особенности селекции клещевины.....	204
О.М. Борисенко, Ю.В. Чебанова, Я.Н. Демулин. Влияние веерообразного жилкования листа на краевые язычковые цветки у подсолнечника	205
Е.Д. Васильева, Е.И. Рачек, Д.Ю. Амвросов, В.П. Васильев. Генетические механизмы определения пола у осетровых рыб	207
В.В. Волкова, Т.Е. Денискова, А.А. Филипченко, Н.А. Зиновьева. Исследование информативности системы анализа полиморфизма микросателлитов для рутинного тестирования коз.....	208
В.В. Волкова, О.С. Романенкова, О.В. Костюнина, Н.А. Зиновьева. Характеристика аллелофонда региональных популяций холмогорской породы крупного рогатого скота с использованием STR-маркеров.....	210
А.Г. Галаян, П.И. Костылев, А.С. Казакова. Оценка образцов риса на устойчивость к длительному затоплению	212
А.М. Гареева, И.Ю. Долматова, А.В. Юрина. Генетическая структура популяции лошадей башкирской породы по локусу пигментообразования Agouti	213
Л.В. Гетманцева, Н.Ф. Бакоев, О.В. Костюнина, С.Ю. Бакоев, А.В. Радюк. Поиск генетических маркеров воспроизводительной продуктивности свиней.....	215
О.Ф. Горбаченко, Ф.И. Горбаченко, В.Д. Горбаченко, Т.В. Усатенко, Н.С. Лучкин, Н.А. Житник, Е.Г. Бурляева. Селекция ЦМС линий подсолнечника различных групп спелости, выносливых к вирулентным расам заразики OROBANCE CUMANA WALLR	216
Ж.А. Елисеева, Э. О.Бычкова, Л. В. Барабанова, А. В. Марков. Молекулярно-генетическая характеристика жёлтых окрасов у кошек породы курильский бобтейл	218
К.А. Ефетов, З.С. Лазарева. Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ видов рода <i>Rhagades Wallengren</i> , 1863 (LEPIDOPTERA, ZYGAENIDAE).....	219
Е.В. Картамышева, Т.Н. Лучкина, Л.П. Збраилова, Г.В. Бокий. Адаптивная селекция сафлора	220
А.А. Ковалевич, М.С. Макаренко, А.В. Усатов. Особенности экспрессии хлоропластных генов у хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника с внеядерным типом наследования.....	221
Н.В. Козлова, Е.Г. Макарова, М.А., Барегамян, А.В. Мирзоян. Современные подходы к сохранению генетического разнообразия осетровых рыб Волжско-Каспийского рыбохозяйственного бассейна	222
М.А. Колосова, Л.В. Гетманцева, Н.Ф. Бакоев, А.Ю. Колосов. Ассоциативные связи полиморфизма мтДНК с продуктивными качествами свиней.....	224
П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.В. Аксенов, Э. С. Балюкова. Наследование окраски перикарпа и других признаков риса	225
И.В. Лазебная, Ю.А. Столповский, О.Е. Лазебный. Поиск связи генетической изменчивости пород крупного рогатого скота с происхождением.....	227
Н.В. Маркин, Е.В. Доценко, Н.С. Колоколова, К.Ф. Кан, А.В. Усатов. Генотипирование однолетних видов подсолнечника с использованием микросателлитных маркеров.....	228
Л.В. Новоселова, С.Н. Жакова, А.С. Чугайнова. Генетические ресурсы и репродуктивная биология <i>Syringa vulgaris</i> L.....	229
С.Н. Петров, Т.Е. Денискова, А.В. Доцев, М.С. Форнара, И.В. Гусев, Н.А. Зиновьева. Создание ресурсной популяции овец для картирования QTL, ассоциированных со скоростью роста как новый этап геномных исследований овец в России.....	231
С.Н. Петров, В.Р. Харзинова, О.В. Костюнина, А.В. Доцев, Н.А. Зиновьева. Идентификация пола с использованием гена амелогенина: практическое применение у видов семейства полорогие.....	232
С.М. Расторгуев, А.А. Волков, Г.М. Шалгимбаева. Генетические отличия между двумя породными группами домашнего карпа (<i>Cyprinus carpio</i>).....	233

Б.В. Романов, А.С. Азаров. Гомолог мягкой пшеницы из <i>Triticum kiharae</i>	234
С.В. Сыксин, Ю.Ю. Кулакова, В.Г. Кулаков, А.Ю. Хохлов, Д.Ю. Муравьева, А.А. Соловьев. Разработка и апробация новых видоспецифических праймеров на растения рода <i>Secchrus</i>	235
Э.Б. Хатефов, Г.В. Матвеева. Селекционная ценность линий кукурузы, выделенных из тетраплоидных популяций методом редиплоидизации	236
В.А. Чохели, А.Н. Шмараева, И.П. Кузьменко, Ж.Н. Шишлова, Т.В. Вардуни. Генетическая идентификация «краснокнижных» видов рода катран (<i>Crambe L.</i>) с применением ISSR-праймеров	237
В.В. Чумакова, В.Ф. Чумаков, Н.М. Романенко. Генофонд ресурсов лекарственных растений и его использование в селекции на Юге России	239
В.С. Шевцова, Л.В. Гетманцева, А.В. Усатов, М.А. Колосова. Ген лептина – перспективный маркер продуктивных качеств овец.....	240
Д.П. Камфарин, И.В. Корниенко, М.С. Макаренко, Т.П. Шкурат. Генетические характеристики донской породы лошадей.....	241

Для заметок

Научное издание

**ГЕНЕТИКА – ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОСНОВА
ИННОВАЦИЙ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЕКЦИИ**

*Материалы VIII научно-практической конференции
с международным участием*

Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г.

Редактор *Ю.А. Пехтерева*

Компьютерная верстка *А.О. Дайкер*

Подписано в печать 20.09.2019 г.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Формат 60×84 ¹/₈.

Усл. печ. лист. 29,53. Уч. изд. л. 31,5. Заказ № 7220. Тираж 300 экз.

Отпечатано в отделе полиграфической, корпоративной и сувенирной продукции

Издательско-полиграфического комплекса КИБИ МЕДИА ЦЕНТРА ЮФУ.

344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 200/1, тел (863) 243-41-66.